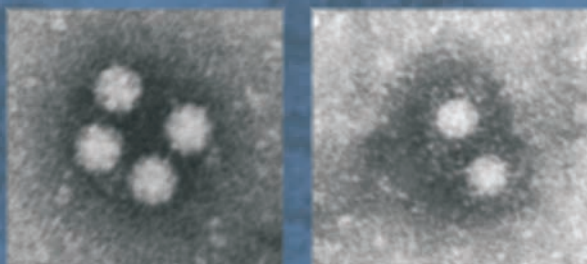


NOROVIREN UND SAPOVIREN BEI LANDWIRTSCHAFTLICHEN NUTZTIEREN

BARBARA REGINA BANK-WOLF



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

Noroviren und Sapoviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Barbara Regina Bank-Wolf

Tierärztin aus Worms

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 11.12.2007

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Meinen Eltern

„Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts. Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.“

Pierre Teilhard de Chardin

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Tabellenverzeichnis	V
	Abbildungsverzeichnis	VI
	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Taxonomie und Phylogenie von Caliciviren	2
2.1.1	Taxonomie	2
2.1.2	Phylogenie	3
2.1.2.1	Genus <i>Norovirus</i>	3
2.1.2.2	Genus <i>Sapovirus</i>	3
2.2	Geschichte von Noro- und Sapoviren sowie der durch sie induzierten Erkrankungen	5
2.2.1	Humane Noroviren	5
2.2.2	Animale Noroviren	6
2.2.3	Humane Sapoviren	7
2.2.4	Animale Sapoviren	8
2.3	Morphologie und Molekularbiologie von Noro- und Sapoviren	9
2.3.1	Morphologie	9
2.3.2	Molekularbiologie	10
2.3.2.1	Genomorganisation der Noroviren	12
2.3.2.2	Genomorganisation der Sapoviren	13
2.3.3	Rekombination	14
2.4	Übertragungswege	14
2.5	Immunität gegenüber Noro- und Sapovirusinfektionen	16
2.5.1	Antikörper	16
2.5.2	Genetische Faktoren	17
2.6	Diagnostik von Noro- und Sapovirusinfektionen	17
2.6.1	Klinisches Bild	17
2.6.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	18
2.6.3	Zellkultursysteme	18
2.6.3.1	Noroviren	18
2.6.3.2	Sapoviren	18
2.6.4	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	19
2.6.4.1	Antigen-ELISA	19
2.6.4.2	Antikörper-ELISA	20
2.6.5	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	20
2.7	Epidemiologische Studien	22
2.7.1	Humane Noro- und Sapoviren	22
2.7.2	Animale Noro- und Sapoviren	22
2.7.2.1	Bovines Norovirus	24
2.7.2.2	Porzines Norovirus	24
2.7.2.3	Porzines enterales Sapovirus	25
2.8	Prävention und Bekämpfung	25
2.8.1	Symptomatische Therapie	25
2.8.2	Prophylaxe	25
2.8.3	Impfung	26
2.8.3.1	Art der Impfstoffe, Zielgruppen	26
2.8.3.2	Impfversuche	26
2.8.3.2.1	Maus	26
2.8.3.2.2	Kalb	27
2.8.3.2.3	Mensch	27
2.8.4	Desinfektion	27

2.9	Noro- und Sapoviren als Zoonoseerreger?	28
2.9.1	Virusnachweis/Rekombination	28
2.9.2	Antikörpernachweis	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Material	30
3.1.1	Zellen	30
3.1.2	Viren und Antikörper	30
3.1.3	Probenmaterial	31
3.1.3.1	Probenentnahme	31
3.1.3.2	Herkunft des Probenmaterials	31
3.1.3.3	Fragebogen	32
3.1.3.4	Statistische Auswertung	33
3.1.4	Enzyme und Enzympuffer	34
3.1.5	Vorgefertigte Medien und Systeme ("Kits")	34
3.1.6	Chemikalien und Reagenzien	34
3.1.7	Allgemeine Medien und Puffer	35
3.1.8	Medien und Puffer für Zellkultur	35
3.1.9	Puffer für reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	35
3.1.10	Lösungen für DNS-Klonierung	36
3.1.11	Lösungen für Sequenzgele	36
3.1.12	Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und PAGE-Färbung	36
3.1.13	Lösungen und Puffer für VLP-Reinigung	37
3.1.14	Verbrauchsmaterialien	37
3.1.15	Geräte	37
3.1.16	Genbank-Zugangsnummern	38
3.1.16.1	Norovirus	38
3.1.16.2	Sapovirus	41
3.1.16.3	Weitere Caliciviren	43
3.2	Methoden	44
3.2.1	Zellkulturtechniken	44
3.2.1.1	Insektenzellen (SF-21)	44
3.2.1.2	Säugerzellen	44
3.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	44
3.2.1.4	Infektion von bovinen, ovinen und SF21-Zellen	45
3.2.1.5	Kryokonservierung von Zellen	46
3.2.2	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	46
3.2.2.1	Aufarbeitung von Kotproben für die RNS-Präparation	46
3.2.2.2	Aufarbeitung von Organproben für die RNS-Präparation	46
3.2.2.3	RNS-Präparation	46
3.2.2.4	DNS-Extraktion	47
3.2.2.5	Reverse Transkription	47
3.2.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
3.2.2.7	Auswahl der Primer	48
3.2.2.8	RT-PCR-Protokolle	49
3.2.2.8.1	RT-PCR	49
3.2.2.8.1.1	Norovirus RT-PCR (Teil des Polymerasegens)	49
3.2.2.8.1.2	Norovirus RT-PCR (Teil des Kapsidgens)	50
3.2.2.8.1.3	Sapovirus RT-PCR (Teil des Polymerasegens)	50
3.2.2.8.1.4	Sapovirus RT-PCR (Teil des Kapsidgens)	50
3.2.2.8.2	„One Step“ RT-PCR	50
3.2.2.8.3	DNS-PCR (Standard-Protokoll)	51
3.2.2.9	Analyse der PCR-Produkte	52
3.2.2.10	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	52
3.2.3	Klonierung von DNS-Fragmenten	53
3.2.3.1	Ligation	53
3.2.3.2	Transformation	54
3.2.3.3	Minipräparation von Plasmid-DNS	55
3.2.3.4	Spaltung mit Restriktionsenzymen	55
3.2.4	DNS-Sequenzierung	56
3.2.4.1	Sequenz-PCR	56

3.2.4.2	Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen	57
3.2.4.3	Auswertung der Sequenzdaten	58
3.2.5	Phylogenetische Analysen	58
3.2.6	Elektronenmikroskopie	58
3.2.6.1	Vorbereitung von Kot- und Organproben für die Elektronenmikroskopie	58
3.2.6.2	Untersuchung von Probennetzchen im Elektronenmikroskop	59
3.2.6.3	Immunelektronenmikroskopie	59
3.2.6.4	Präparation von Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie	60
3.2.7	Herstellung von rekombinanten virusähnlichen Partikeln (VLPs) mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems	60
3.2.7.1	Gewinnung von Sequenzdaten des gesamten VP1 und VP2	60
3.2.7.2	Vektor pBlueBacHis2A (Fa. Invitrogen)	61
3.2.7.2.1	Herstellung der gewünschten Inserts	61
3.2.7.2.1.1	Restriktionsverdau	62
3.2.7.2.1.2	Ligation	62
3.2.7.2.1.3	Transformation	62
3.2.7.2.1.4	Minipräparation von Plasmid-DNS	63
3.2.7.3	Transfektion von Insektenzellen	63
3.2.7.4	Plaque-Reinigung des Transfektions-Virusstocks	64
3.2.7.4.1	Plaque-Test	64
3.2.7.4.2	Vermehrung rekombinanter Plaques	64
3.2.7.4.3	Analyse der vermehrten Plaques	65
3.2.7.4.4	Zweite Plaquereinigung	65
3.2.7.5	Western Blot (Semi Dry-Verfahren)	65
3.2.7.6	Coomassie-Färbung von Proteinen	67
3.2.7.7	Herstellung von virusähnlichen Partikeln (VLPs)	68
3.2.7.7.1	Gradientenreinigung von VLPs	68
3.2.7.7.2	Proteinbestimmung	68
4	Ergebnisse	69
4.1	Detektion und Analyse von Noroviren	70
4.1.1	Nachweis von Norovirus RNS mit Hilfe der RT-PCR	70
4.1.1.1	Polymerasegen	70
4.1.1.2	Kapsidgen	71
4.1.2	Phylogenetische Analysen	75
4.1.2.1	Ermittlung von Nukleinsäureteilsequenzen	75
4.1.2.2	Phylogenetische Analysen der Sequenzen aus dem Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RdRp)	77
4.1.2.3	Phylogenetische Analysen der Sequenzen aus dem Bereich des Kapsidgens (VP1)	78
4.1.2.4	Häufigkeitsverteilungen der Distanzen von Noroviren in Teilbereichen der für die RNS-abhängige RNS-Polymerase und der für das Kapsid kodierenden Genombereiche	82
4.1.2.5	Analyse nicht noroviraler Sequenzen	84
4.1.3	Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Noroviren	85
4.1.4	Infektion boviner und oviner Zellen	86
4.1.5	Statistische Auswertung	87
4.1.5.1	Eingesandte Kot- und Organproben von Rindern	87
4.1.5.1.1	Jahreszeitliche Verteilung	87
4.1.5.1.2	Alter/ Rasse/ Geschlecht/ Herkunft	88
4.1.5.1.3	Symptome Einzeltier	90
4.1.5.1.4	Angaben zum Bestand	92
4.1.5.2	Fragebogenaktion Rind	92
4.1.5.2.1	Jahreszeitliche Verteilung	92
4.1.5.2.2	Alter/ Rasse/ Geschlecht/ Herkunft	93
4.1.5.2.3	Betriebsform/Bestandsprobleme	94
4.1.5.2.4	Symptome der Einzeltiere	95
4.1.5.3	Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse	96
4.2	Detektion und Analyse von Sapoviren	98
4.2.1	Nachweis von Sapovirus RNS mit Hilfe der RT-PCR	98
4.2.1.1	Polymerasegen	98
4.2.1.2	Kapsidgen	98
4.2.2	Phylogenetische Analysen	102

4.2.2.1	Ermittlung von Nukleinsäureteilsequenzen.....	102
4.2.2.2	Phylogenetische Analysen im Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RdRp).....	103
4.2.2.3	Phylogenetische Analysen im Bereich des Kapsidgens (VP1).....	103
4.2.2.4	Phylogenetische Analysen im Bereich des RdRp-VP1 Übergangsbereiches.....	103
4.2.2.5	Häufigkeitsverteilungen der Distanzen von Sapoviren in Teilbereichen der für die RNS-abhängige RNS-Polymerase und der für das Kapsid kodierenden Genombereiche.....	106
4.2.2.6	Analyse nicht sapoviraler Sequenzen.....	108
4.2.3	Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Sapoviren.....	109
4.2.4	Statistische Auswertung.....	109
4.2.4.1	Fragebogenaktion Schwein.....	109
4.2.4.1.1	Jahreszeitliche Verteilung.....	110
4.2.4.1.2	Betriebsform/Bestandsprobleme.....	111
4.2.4.1.3	Symptome Einzeltier.....	112
4.2.4.2	Zusammenfassung der statistischen Untersuchung.....	113
4.3	Produktion von virusähnlichen Partikeln (VLPs).....	114
4.3.1	Expression des Strukturproteins VP1 des porzinen enteralen Sapovirus (Stamm PEC Cowden).....	114
4.3.1.1	Produktion von VLPs.....	114
4.3.1.2	Nachweis der Expression des VP1.....	115
4.3.1.3	Produktion von PEC-VLPs.....	116
4.3.2	Co-Expression der Strukturproteine VP1 und VP2 von Noroviren sowie Sapoviren mit Hilfe rekombinanter Baculoviren.....	119
4.3.2.1	Grundlagen und Prinzipien der Expression.....	119
4.3.2.2	Porzines enterales Sapovirus (rM25).....	124
4.3.2.2.1	Nachweis der Expression des Kapsidproteins VP1.....	124
4.3.2.2.2	Produktion von porzinen enteralen Sapovirus-VLPs.....	125
4.3.2.3	Bovines Norovirus (r18161).....	127
4.3.2.3.1	Nachweis der Expression des Kapsidproteins VP1.....	127
4.3.2.3.2	Produktion von bovinen Norovirus-VLPs.....	127
4.3.3	Zusammenfassung: Produktion von VLPs.....	129
5	Diskussion.....	130
5.1	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	131
5.2	Nachweis von Noroviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren.....	133
5.3	Nachweis von Sapoviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren.....	135
5.4	Phylogenetische Analysen der detektierten Noro- und Sapovirusisolate.....	137
5.4.1	Norovirus.....	137
5.4.2	Sapovirus.....	139
5.4.3	Statistische Zuverlässigkeit der phylogenetischen Bäume.....	140
5.4.4	Genetische Distanzen der für die phylogenetischen Bäume verwendeten Isolate.....	140
5.4.5	Rekombination.....	141
5.5	Produktion virusähnlicher Partikel (VLPs) und deren Einsatz für die Diagnostik.....	142
5.6	Bedeutung animaler Noro- und Sapoviren als Infektionserreger für landwirtschaftliche Nutztiere.....	145
5.7	Bedeutung animaler Noro- und Sapoviren als Infektionserreger für den Menschen.....	146
6	Zusammenfassung.....	148
7	Summary.....	150
8	Literaturverzeichnis.....	152
9	Anhang.....	168
9.1	Rohdaten der untersuchten Kot- und Organproben.....	168
9.1.1	Rohdaten Rind – eingesandte Proben.....	169
9.1.2	Rohdaten Rind - Fragebogenaktion.....	196
9.1.3	Rohdaten Schwein.....	204

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Taxonomie der Familie <i>Caliciviridae</i>	2
Tab. 2: Seroprävalenz boviner und porziner Noro- und Sapoviren.....	22
Tab. 3: Virus-Prävalenz boviner und porziner Noro- und Sapoviren.....	24
Tab. 4: Auflistung der gesammelten Proben nach Tierarten.	31
Tab. 5: Genbankzugangsnummern von Vertretern des Genus <i>Norovirus</i>	41
Tab. 6: Genbankzugangsnummern von Vertretern des Genus <i>Sapovirus</i>	43
Tab. 7: Genbankzugangsnummern von Vertretern der Genera <i>Vesivirus</i> , <i>Lagovirus</i> und nicht klassifizierten Genus innerhalb der Familie <i>Caliciviridae</i>	43
Tab. 8: Primer zur Detektion von Noro- und Sapoviren.....	49
Tab. 9: Standard-Protokoll für RT-PCR.....	49
Tab. 10: Protokoll der „One Step“ RT-PCR® (Fa. Qiagen).....	51
Tab. 11: Standardprotokoll für DNS-PCR.....	51
Tab. 12: Mix für Ligation mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Fa. Invitrogen).....	54
Tab. 13: Zusammensetzung der Ansätze für einen Restriktionsverdau.....	56
Tab. 14: Protokoll der Sequenz-PCR mit den Primern M13IR und M13IRrev.....	57
Tab. 15: Herstellung von cDNA mit einem oligoDT-21 Primer.....	60
Tab. 16: Primer zur Sequenzierung des VP1 und VP2 von bovinen Noroviren sowie porzinen enteralen Sapoviren.....	61
Tab. 17: Primer mit Schnittstellen zur Klonierung in Baculovirus Transfervektor pBlueBacHis2A® (5'-3').....	61
Tab. 18: Ansatz für Restriktionsverdau zur Klonierung in den Vektor pBlueBacHis2A® (Fa. Invitrogen).....	62
Tab. 19: Ligationsmix.....	62
Tab. 20: Zusammensetzung Transfektionsmix.....	63
Tab. 21: Ergebnisse der mit Hilfe der Primer JV12Y/13I (Vennema et al., 2002) auf Norovirus RNS untersuchten Proben nach Tierarten.....	70
Tab. 22: Auflistung der in der Norovirus RT-PCR positiven Proben von Rindern.....	74
Tab. 23: Genbank-Zugangsnummern Norovirusisolate.....	77
Tab. 24: Auflistung der in der RT-PCR (Primerpaare JV12Y/13I, NoV-Bac-01F/02R) falsch positiven Proben.....	85
Tab. 25: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Proben von Rindern.....	97
Tab. 26: Ergebnisse mit Hilfe der Primer JV33/SR80(+) (Vinje et al., 2000a) auf Sapovirus RNS untersuchten Proben nach Tierarten.....	98
Tab. 27: Proben von Schweinen, untersucht mit dem PEC-spezifischen Primerpaar PEC-02R/03F.....	98
Tab. 28: Auflistung der in der Sapovirus RT-PCR (Primer SR80(+)/JV33 und/oder PEC-03F/02R) positiven Proben von Schweinen.....	101
Tab. 29: Genbank-Zugangsnummern Sapovirusisolate.....	102
Tab. 30: Auflistung der in der RT-PCR (Primerpaare SR80(+)/JV33, PEC-03F/02R) falsch positiven Proben.....	108
Tab. 31: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Fragebogenaktion Schwein.....	113

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phylogenetischer Baum der Familie <i>Caliciviridae</i> .	4
Abb. 2: Elektronenmikroskopisches Bild von Caliciviren.	9
Abb. 3: Norwalk-Virus Kapsid als Beispiel für das VP1 von Caliciviren.	10
Abb. 4: Genomorganisation und Spaltprodukte des ORF1 von Noroviren.	12
Abb. 5: Genomorganisation und Spaltprodukte des ORF1 von Sapoviren.	13
Abb. 6: Übertragungswege für Calicivirusinfektionen beim Menschen und bei landwirtschaftlichen Nutztieren.	15
Abb. 7: Geographische Verteilung der Herkunft der in dieser Arbeit untersuchten Kot- und Organproben.	32
Abb. 8: Fragebogen bei Probennahme.	33
Abb. 9: Transfektion von Insektenzellen, Plaquereinigung und Produktion hochtitriger Virusstocks.	66
Abb. 10: PCR zum Nachweis von Norovirus RNS. Lokalisation der Primerpaare JV12Y/13I sowie NoV-Bac-01F/02R.	72
Abb. 11: Agarosegel der PCR-Produkte sowie der Minipräparationen nach Kontrollverdau.	75
Abb. 12: Phylogenetischer Baum von Vertretern des Genus <i>Norovirus</i> auf der Basis von 250 Basen des RdRp Gens.	79
Abb. 13: Ausschnittsvergrößerung der Genogruppe III der Noroviren aus Abb. 12.	80
Abb. 14: Phylogenetischer Baum von Vertretern des Genus <i>Norovirus</i> auf der Basis von 739 Basen des Kapsidgens.	81
Abb. 15: Häufigkeitsverteilungen der Divergenzen von Norovirus-Sequenzen.	83
Abb. 16: Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Noroviruspartikeln.	86
Abb. 17: Probenverteilung der eingesandten Proben von Rindern nach Jahreszeiten sowie positivem Norovirusgenomnachweis.	88
Abb. 18: Altersverteilung der eingesandten Proben von Rindern (Alter in Monaten).	89
Abb. 19: Symptomgruppen/Organsysteme, die bei den beprobten Tieren vorlagen/betroffen waren (eingesandte Proben).	90
Abb. 20: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Rota- und Coronaviren im Hinblick auf die Gesamtprobenzahl sowie das gleichzeitige Auftreten von Norovirusinfektionen.	91
Abb. 21: Pathologisch-anatomische Diagnosen.	91
Abb. 22: Jahreszeitliche Verteilung der Proben von Rindern (Fragebogenaktion) und des positiven Norovirusgenomnachweises.	92
Abb. 23: Altersverteilung der Proben von Rindern der Fragebogenaktion.	93
Abb. 24: Bestandsprobleme in den im Rahmen der Fragebogenaktion beprobten Beständen.	95
Abb. 25: Symptomgruppen/Organsysteme, die bei den beprobten Tieren vorlagen/betroffen waren.	96
Abb. 26: RT-PCR zum Nachweis von Sapovirus RNS. Lokalisation der Primerpaare JV33/SR80(+) sowie Pec-02R/03F im Sapovirus Genom.	100
Abb. 27: Phylogenetischer Baum von Vertretern des Genus <i>Sapovirus</i> auf der Basis von 228 Basen der RdRp.	104
Abb. 28: Phylogenetischer Baum von Vertretern des Genus <i>Sapovirus</i> auf der Basis von 351 Basen des Kapsidgens.	105
Abb. 29: Häufigkeitsverteilungen der Divergenzen von Sapovirus-Sequenzen.	107
Abb. 30: Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Sapoviruspartikeln in einer Kotprobe eines infizierten Schweines.	109
Abb. 31: Probenverteilung der eingesandten Proben von Schweinen nach Jahreszeiten sowie positivem Sapovirusgenomnachweis.	110
Abb. 32: Altersverteilung der Proben von Schweinen.	111
Abb. 33: Symptome der Einzeltiere (Schweine).	112
Abb. 34: Mikroskopisches Bild von SF-21 Zellen.	115
Abb. 35: Immunfluoreszenz an SF21 Zellen.	116

Abb. 36: Elektronenmikroskopische Bilder von Baculoviren und eines PEC-VLPs.....	117
Abb. 37: Elektronenmikroskopisches Bild von SF21-Zellen.....	118
Abb. 38: Schematische Darstellung der Stabilisierung von VLPs durch VP2 nach Bertolotti-Ciarlet.....	119
Abb. 39: Klonierung von VP1 und VP2 von Noro- und Sapoviren in den Baculovirus Transfervektor pBlueBacHis2A®.....	121
Abb. 40: Vorgehen zur Klonierung des gewünschten Fragmentes in den Baculovirusexpressionsvektor pBlueBacHis2A®.....	122
Abb. 41: Identifizierung rekombinanter rM25-Plaques.....	123
Abb. 42 : Western Blot von rM25 (porzine enterale Sapovirus VLPs).....	125
Abb. 43: A) Coomassie-Färbung und B) Western Blot einzelner Fraktionen der Gradientenreinigung von rM25.....	126
Abb. 44: Western Blot von Überstand von r18161P10 und r18161P12.....	127
Abb. 45: Coomassie-Färbung und Western Blot einzelner Fraktionen der Gradientenreinigung von r18161.....	128
Abb. 46: Elektronenmikroskopisches Bild von Norovirus-VLPs (Negativkontrastierung).....	129

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
(v/v)	„volume per volume“
(w/v)	„weight per volume“
(w/w)	„weight per weight“
A	Adenosin-Base
Abb.	Abbildung
AcMNPV	„ <i>Autographa californica multiple-embedded nuclear polyhedrosis virus</i> “
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATCC	„ <i>American Tissue Culture Collection</i> “
B	Basen
Bac	Baculovirus
BCA	„ <i>bicinchoninic acid</i> “
BEL	„ <i>bovine embryonic lung</i> “ (bovine embryonale Lungenzellen)
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BLAST	„ <i>basic local alignment search tool</i> “
Bo	bovin
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin-Base
ca.	circa
CaCV	Canines Calicivirus
CCM	„ <i>cell culture medium</i> “ (Zellkulturmedium)
CCN	„ <i>cerebro-cortical necrosis</i> “ (Zerebrokortikalnekrose)
CDC	„ <i>Center for Disease Control</i> “
cDNS	„ <i>copy-DNS</i> “ (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CsCl	Cäsiumchlorid
C-terminal	Carboxyterminal
dd	doppelt destilliert
def.	defizient
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythimidintriphosphat
DKFZ	Deutsches Krebs-Forschungs-Zentrum
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„ <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> “
Fa.	Firma
FB	Fachbereich
FCV	Felines Calicivirus
FKS	Fetales Kälberserum
FUT	Fukosyltransferase

g	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanidin-Base
GCG	<i>Genetic Computer Group</i>
GG	Genogruppe
h	„hour“
H ₂ O	Wasser
HBGA	Histoblutgruppenantigen
Hu	human
HUSAR	<i>Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources</i>
I	Inosin-Base
ICP	„intestinal content preparation“ (präparierter Darminhalt)
ICTV	„International Committee on Taxonomy of Viruses“
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IR	Infrarot
IRES	„internal ribosomal entry site“
ISCOM	„immunostimulating complex“
JLU	Justus-Liebig-Universität Gießen
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KP	Kotprobe
KV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
M	molar
mA	Milliampere
MDBK	„Madin Darby bovine kidney“ (Rindernierenzellen)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mLT	„mutant <i>E.coli</i> heat-labile toxin“
mM	Millimol
mm	Millimeter
MNV-1	Murines Norovirus 1
MOI	„multiplicity of infection“
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
N	Nukleotid A, G, C oder T
n.d.	nicht durchgeführt
NK	negative Kontrollprobe
nm	Nanometer
NoV	Norovirus
N-terminal	Aminoterminal
ORF	„open reading frame“ (offener Leserahmen)
p.A.	„pro analysis“
p.i.	„post infectionem“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
part.	partiell
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PEC	Porzines enterales Calicivirus
pfu/ml	„plaque-forming units per milliliter“
PHYLIP	„phylogeny inference package“
PK	positive Kontrollprobe
pMol	Pikomol

p.o.	„per os“
Po	porzin
PO	Peroxidase
ppm	„parts per million“
Rd.	Rind
RdRp	„RNA-dependent RNA-polymerase“ (RNS-abhängige RNS-Polymerase)
RNase	Ribonuklease
RNA	„ribonucleic acid“
RNS	Ribonukleinsäure
r	rekombinant
rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SaV	Sapovirus
Schw.	Schwein
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
Sek.	Sekunde(n)
SF-21	Spodoptera frugiperda 21 Zellen
SFT-R	„sheep fetal thymoid“ (fetale Schaf-Thymus Zellen)
SOC	SOB (<i>super optimal broth</i>)-Medium plus Glukose
SRSV	„small round structured viruses“
T	Thymin-Base
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
Taq	„thermus aquaticus“
TE	Tris EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEN	Tris EDTA Natriumchlorid Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Umdrehungen
U	„unit“ (Einheit)
u.a.	unter anderem/und andere
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEE	Venezuelan Equine Encephalitis
VLP	„virus-like particles“ (virusähnliche Partikel)
VP	Virusprotein
VPg	„virus protein, genome-linked“ (genomgebundenes Virus-Protein)
W	Watt
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galactopyranosid
Y	Nukleotid C oder T
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung und Zielsetzung

Infektionen mit Noro- und Sapoviren sind beim Menschen weit verbreitet. Insbesondere Noroviren nehmen als bedeutendste Verursacher aller nicht-bakteriell bedingten epidemischen Gastroenteritiden einen großen Stellenwert im Gesundheitssystem ein.

Der Nachweis von Noro- und Sapoviren im Kot sowohl gesunder als auch an Durchfall erkrankter Schweine und Rinder (Saif et al., 1980; van der Poel et al., 1996; Sugieda et al., 1998; Dastjerdi et al., 1999; Liu et al., 1999) hat das öffentliche Interesse an einer möglichen Übertragung von Noro- und Sapoviren vom Tier auf den Menschen und einer denkbaren Reservoirfunktion dieser Tiere für enterale Calicivirusinfektionen des Menschen verstärkt (Guo et al., 2001a).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Prävalenz und Bedeutung von Noro- und Sapoviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren zu ermitteln. Dazu wurden Kot- und Organproben von Rindern, Schweinen und kleinen Wiederkäuern gesammelt und mit Hilfe von breit-reagierenden Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) Tests auf das Vorhandensein von Noro- und Sapovirus-RNS untersucht. Anhand eines Fragebogens wurde die Probensammlung anamnestisch begleitet. Nach Klonierung und Sequenzierung von Nukleinsäureteilsequenzen der in der RT-PCR positiven Proben ließ sich anhand phylogenetischer Analysen der Verwandtschaftsgrad der animalen Viren untereinander sowie zu den entsprechenden humanen Vertretern ermitteln und interpretieren. Hieraus ergaben sich Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle landwirtschaftlicher Nutztiere als Reservoir für die Infektion beim Menschen. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sollten zusätzlich klären, ob eine Notwendigkeit zur Entwicklung neuer diagnostischer Tests und Vakzinen für landwirtschaftliche Nutztiere besteht.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten mit Hilfe des Baculovirusexpressionssystems virusähnliche Partikel (VLPs) produziert werden. Das Kapsidprotein VP1 von Noro- und Sapoviren hat die Eigenschaft, nach Expression in heterologen Systemen selbsttätig zu VLPs zu aggregieren, die den nativen Virionen morphologisch und antigenetisch sehr ähnlich sind und somit als Antigen in verschiedenen Testsystemen eingesetzt werden. Diese VLPs sollten für nachfolgende Arbeiten, beispielsweise zur Etablierung von Antikörper-ELISAs (Enzyme linked immunosorbent assay), mit denen Seren von landwirtschaftlichen Nutztieren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Noro- und Sapoviren getestet werden können, zur Verfügung stehen.

2 Literaturübersicht

2.1 Taxonomie und Phylogenie von Caliciviren

2.1.1 Taxonomie

Noroviren und Sapoviren gehören zur Virusfamilie *Caliciviridae* und bilden dort eigenständige Genera. Die Familie der *Caliciviridae* wird auf der Basis von Sequenzdaten und phylogenetischen Analysen in vier Genera unterteilt: In das Genus *Vesivirus*, das Genus *Lagovirus* sowie ferner in die Genera *Norovirus* und *Sapovirus* (Fauquet et al., 2005). Ein 1980 in den USA aus dem Kot von Kälbern isoliertes bovines enterales Calicivirus (Stamm Nebraska) (Smiley et al., 2002) kann in keines der bestehenden vier Genera eingeordnet werden und gehört vermutlich zu einem neu zu etablierenden Genus innerhalb der Familie *Caliciviridae*. In Großbritannien wurde bereits 1976 das Newbury agent-1 isoliert (Bridger et al., 1984; Bridger und Dastjerdi, 1997), welches jedoch erst 2006 durch Sequenzierung des Genomes genauer charakterisiert werden konnte. Es besitzt eine 90%-ige (Polymerase) bzw. 98%-ige Aminosäureidentität (Kapsid) zu dem Stamm Nebraska (Oliver et al., 2006a). Oliver et al. schlagen den Genus-Namen *Becovirus* oder *Nabovirus* vor, um diese neue Gruppe boviner Caliciviren abzugrenzen.

In der folgenden Tabelle sind wichtige Vertreter der einzelnen Genera aufgeführt (Nomenklatur nach ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (Fauquet et al., 2005)):

Genus	Vertreter
<i>Vesivirus</i> (VeV)	Virus des Vesikularexanthems der Schweine (VESV), Felines Calicivirus (FCV)
<i>Lagovirus</i> (LaV)	Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV), European brown hare syndrome virus (EBHSV)
<i>Sapovirus</i> (SaV)	Sapporo Virus (SV); vorläufige Vertreter: Enterales Sapovirus der Nerze (MEC), Porzines enterales Sapovirus – Cowden (PEC)
<i>Norovirus</i> (NoV)	Norwalk Virus (NV); vorläufige Vertreter: Porzines Norovirus, bovines Norovirus, Murines Norovirus I (MNV-1)
nicht zugeordnetes Virus innerhalb der Familie	Bovines enterales Calicivirus Stamm Nebraska (NB)

Tab. 1: Taxonomie der Familie *Caliciviridae*.

Die Nomenklatur der einzelnen Isolate (Kryptogramm) erfolgt folgendermaßen: Spezies, aus der das Virus isoliert wurde/Genus/Spezies (oder Genogruppe)/Isolatname/Jahr der Isolierung/Herkunftsland. Für Norwalk Virus ergibt sich dadurch beispielsweise folgendes Kryptogramm: Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US (Green, 2007).

2.1.2 Phylogenie

Die Genera Norovirus und Sapovirus werden nach der Nomenklatur der ICTV weiter eingeteilt in die Spezies Norwalk Virus bzw. Sapporo Virus (Fauquet et al., 2005), die in der Fachliteratur wiederum in Genogruppen und Genotypen unterteilt werden. Hierbei sind Sequenzanalysen, welche die konservierten Bereiche der RNS-abhängigen RNS-Polymerase oder des Kapsidgens umfassen, die Methode der Wahl. Ein phylogenetischer Baum (Abb. 1) zeigt die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den einzelnen Genera.

2.1.2.1 Genus *Norovirus*

Das Genus *Norovirus* lässt sich in fünf Genogruppen unterteilen (Zheng et al., 2006). Die Genogruppe I mit dem Namensgeber Norwalk Virus unterteilt sich in acht Genotypen, die Genogruppe II in 17 (Zheng et al., 2006) bzw. 19 (Wang et al., 2005a) Genotypen, wobei einzelne Genotypen (11, 18 und 19) porcine Norovirus-Isolate beinhalten. Die Genogruppe IV besteht aus nur einem Genotyp mit dem Prototyp Alphantron, einem in den Niederlanden gefundenen Isolat. Die Genogruppen III und V beinhalten ausschließlich animale Noroviren, Genogruppe III die bovinen Noroviren (Newbury agent-2 und Jena) (Ando et al., 2000; Oliver et al., 2003), welche zwei getrennte Genotypen bilden (Jena: GGIII/1 und Newbury agent-2: GGIII/2) (Han et al., 2004) und Genogruppe V die murinen Noroviren.

2.1.2.2 Genus *Sapovirus*

Auch die Vertreter des Genus *Sapovirus* sind in Genogruppen unterteilt (Farkas et al., 2004). Die Genogruppe I beinhaltet humane Sapoviren wie den Namensgeber Sapporo Virus. Die Genogruppen II und IV umfassen ebenfalls humane Vertreter. Genogruppe V beinhaltet ein in Argentinien in der Stuhlprobe eines an Diarrhöe erkrankten Kindes gefundenes Isolat (Martinez et al., 2002). Die humanen Sapoviren werden in acht Genotypen unterteilt (GGI/1-3, GGII/1-3, GGIV-1 und GGV-1) (Schuffenecker et al., 2001). Die porcinen enteralen Sapoviren finden sich überwiegend in Genogruppe III. Zusätzlich wurde 2005 ein neues Cluster porciner enteraler Sapoviren gefunden, das die Genogruppe VI bildet (Wang et al., 2005b). Genogruppe VII umfasst als einzigen Vertreter das enterale Sapovirus der Nerze (MEC).

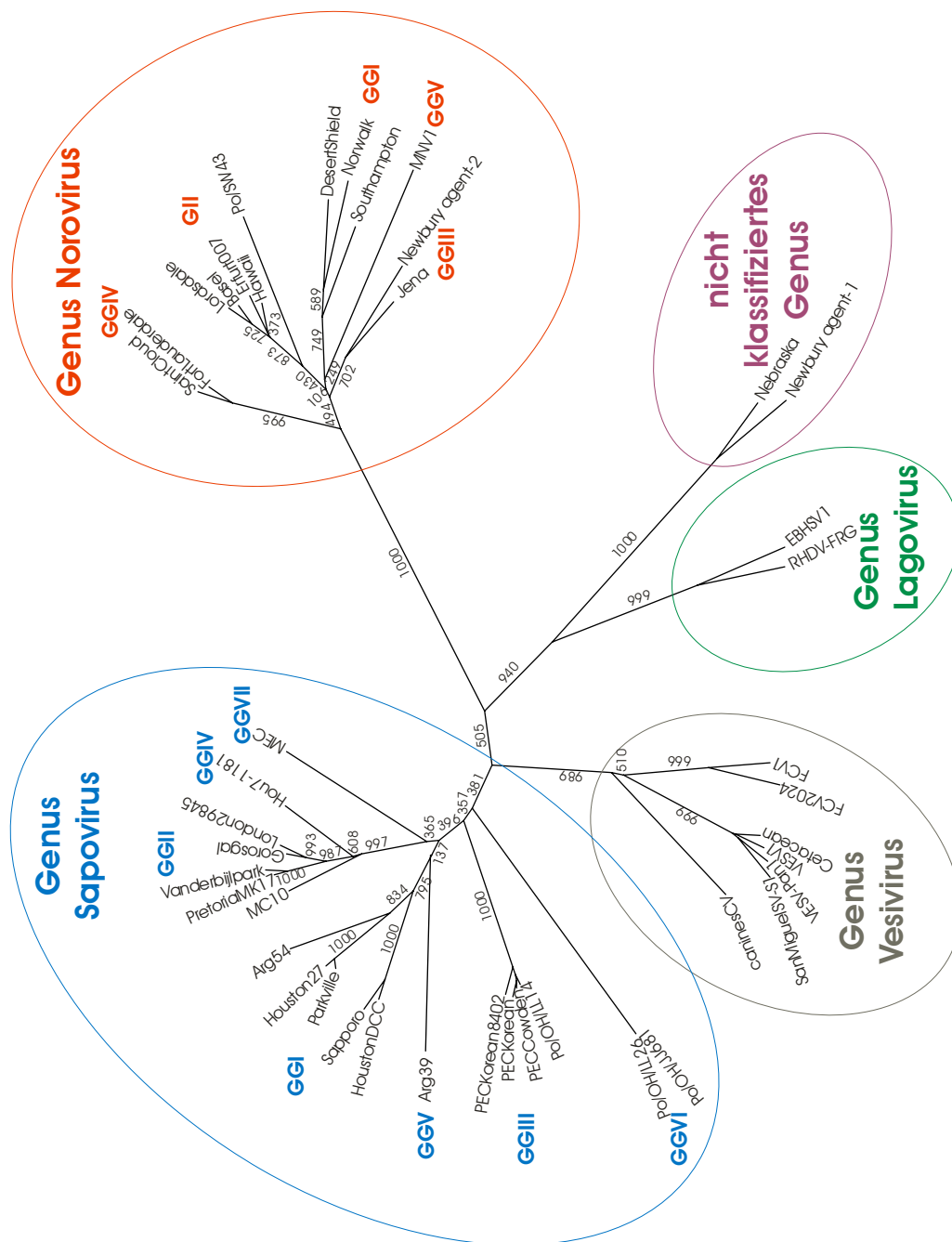


Abb. 1: Phylogenetischer Baum der Familie Caliciviridae.

Erstellt auf Basis eines 227 Basen großen Fragmentes aus der für das Polymerasegen kodierenden Region des Genoms. Für jedes Genus wurden die Sequenzen bekannter Vertreter der Genbank entnommen. Der Vergleich der Sequenzen erfolgte mit dem HUSAR-Programmpaket des DKFZ Heidelberg. Phylogenetische Distanzen wurden mit der Kimura-2-Parameter Methode berechnet; der Baum wurde mit Hilfe der Neighbor-joining Methode generiert. Eine Bootstrap-Analyse mit 1.000 Replikaten wurde durchgeführt; Zahlen stellen Bootstrap-Werte dar. Die Astlängen sind proportional zur genetischen Distanz.

2.2 Geschichte von Noro- und Sapoviren sowie der durch sie induzierten Erkrankungen

2.2.1 Humane Noroviren

In den vergangenen Jahren haben Noroviren weltweit große Bedeutung erlangt und sind derzeit die häufigste Ursache akuter epidemischer nicht-bakterieller Gastroenteritiden beim Menschen (Green, 2007). Der Verlauf einer Norovirusinfektion wurde bereits 1929 als „Winter vomiting disease“ bezeichnet (Zahorsky, 1929). Dieser Name beinhaltet die starke Saisonalität sowie den hohen Prozentsatz der Patienten, die Erbrechen als klinisches Symptom zeigen. Die Erkrankung konnte damals keinen bekannten bakteriellen oder parasitären Erregern zugeordnet werden. Durch Infektion Freiwilliger mit bakterienfreiem Stuhlfiltrat wurde gezeigt, dass Viren die Ursache für die Erkrankung sind (Gordon et al., 1953); das ursächliche Agens konnte zunächst jedoch nicht identifiziert werden. Erst 1972 gelang es vier Jahre nach einem Ausbruch akuter Gastroenteritis an einer Schule in Norwalk/Ohio (Adler und Zickl, 1969) immunelektronenmikroskopisch 27-32 nm große Viruspartikel nachzuweisen (Kapikian et al., 1972; Kapikian, 2000), die nach dem Ort des Ausbruches „Norwalk Virus“ genannt wurden. Da den Virionen die typische Morphologie der Caliciviren fehlt, wurden sie aufgrund ihres Erscheinungsbildes im Elektronenmikroskop zunächst als „small round structured viruses“ (SRSV) bezeichnet. Bereits 1981 untersuchte Greenberg die Proteine des Norwalk Virus und stellte fest, dass diese ähnlich denen anderer Caliciviren sind (Greenberg et al., 1981). Erst 1990 konnte durch Genomuntersuchungen bewiesen werden, dass Noroviren zu den Caliciviren gehören (Jiang et al., 1990). Sie bilden seitdem ein eigenständiges Genus innerhalb der Familie *Caliciviridae*, welches zunächst als „Norwalk-like viruses“ (Green et al., 2000) bezeichnet wurde und seit 2002 den Namen *Norovirus* trägt (Fauquet et al., 2005). Norwalk-Virus ist der Prototyp dieses Genus.

Bereits in den achtziger Jahren wurden Noroviren für 19-42% aller akuten, nicht-bakteriell bedingten Gastroenteritiden beim Menschen verantwortlich gemacht (Kaplan et al., 1982b). Heute gelten Noroviren als hauptsächliche Ursache aller nicht-bakteriell bedingten akuten epidemischen Gastroenteritiden beim Menschen (Green, 2007). Ältere Menschen, Kinder sowie immunsupprimierte Personen sind besonders empfänglich für die Erkrankung. Nach einer Inkubationszeit von 15-36 Stunden kommt es zu einer akuten, selbstlimitierenden Diarrhöe (Simpson et al., 2003). Charakteristisch für eine Norovirusinfektion ist das explosionsartige Erbrechen (meist nur am ersten Tag), das bereits von Kaplan 1982 im Rahmen der für eine Norovirus-Infektion typischen Kaplan-Kriterien (Kaplan et al., 1982a) beschrieben wurde (s. Kapitel 2.6.1). Weitere Symptome sind Fieber, Übelkeit, abdominale

Schmerzen und Krämpfe (Rockx et al., 2002). Durch Versuche mit Stuhlfiltrat bei Freiwilligen konnte gezeigt werden, dass es nach Infektion histologisch zu einer Zottenatrophie sowie Kryptenhyperplasie im proximalen Jejunum kommt, die Mucosa jedoch intakt bleibt (Green, 2007). Das Virus kann bis zu drei Wochen im Stuhl ausgeschieden werden (Rockx, 2004); auch das Erbrochene ist infektiös (Greenberg et al., 1979). Bei Ausbrüchen wurden asymptomatische Virusausscheider beobachtet (Gallimore et al., 2004b). Immunsupprimierte Personen, beispielsweise nach Organtransplantationen, können chronisch infiziert bleiben (Hutson et al., 2004).

Ein Fall einer Norovirus-assoziierten Enzephalopathie bei einem 23 Monate alten Kind wurde in Japan beobachtet. Dabei konnte Norovirus RNS im Liquor detektiert werden (Ito et al., 2006).

In Deutschland ist der Nachweis von Noroviren in humanen Stuhlproben nach §7 des Infektionsschutzgesetzes meldepflichtig; für das Jahr 2005 wurden dem Robert-Koch-Institut in Berlin (Referenzlabor) insgesamt 62.619 Fälle gemeldet (Anonymus, 2006), im Jahr 2006 74.445 Fälle (Anonymus, 2007a). Für das Jahr 2007 wurden bis zur 18. Kalenderwoche bereits 95.067 Fälle gemeldet (Anonymus, 2007b). In den USA gelten Noroviren als „Biodefense category B priority pathogen“; etwa 23 Millionen Fälle pro Jahr werden dort vermutet (Mead et al., 1999).

2.2.2 Animale Noroviren

Zu den animalen Noroviren gehören die bovinen Noroviren Newbury agent-2 und Jena, die bereits 1976 (Newbury agent-2) (Woode und Bridger, 1978) bzw. 1980 (Jena Virus) (Günther und Otto, 1987) aus Kotproben von an Diarrhöe erkrankten neugeborenen Kälbern (Jena) isoliert wurden. Beide zeigen die typische „gefiederte“ Oberfläche der Viruspartikel im Elektronenmikroskop (Bridger et al., 1984; Günther und Otto, 1987). Eine Übertragung auf andere Kälber wurde im Tierversuch gezeigt. Erst Jahre später wurden diese Viren auf molekularer Ebene charakterisiert (Dastjerdi et al., 1999; Liu et al., 1999).

Das bovine Norovirus Jena konnte elf Mal in kolostrumfrei aufgezogenen Kälbern passagiert werden und verursachte in jeder Passage Diarrhöe (Liu et al., 1999). Tierversuche mit dem Newbury agent-2 führten nach einer Inkubationszeit von 12-24 Stunden zu Anorexie sowie einer mit D-Xylose-Malabsorption verbundenen Diarrhöe (Woode und Bridger, 1978). Zielzellen für die Virusreplikation sind die Enterozyten des Jejunums. Histologisch dominierte eine Zottenatrophie besonders im Jejunum (Hall et al., 1984). Viruspartikel waren im Versuch am zweiten Tag nach der Infektion bei Beginn klinischer Symptome im Kot nachweisbar (Dastjerdi et al., 1997).

Das porcine Norovirus wurde 1997 aus Kotproben gesunder Schweine in Japan (Sugieda et al., 1998) und 1996 in den Niederlanden (van der Poel et al., 1996) isoliert. Im Tierversuch

konnte gezeigt werden, dass porcine Noroviren in gnotobiotischen Schweinen replizieren und eine milde Diarrhöe auslösen (Wang et al., 2005a).

Weitere Vertreter der animalen Noroviren sind die murinen Noroviren. Eine Infektion mit dem murinen Norovirus 1 (MNV-1) ließ sich erstmals in den USA bei immuninkompetenten Labormäusen nachweisen (Karst et al., 2003). MNV-1 verursacht bei immuninkompetenten Labormäusen, denen bestimmte Kompartimente der angeborenen Immunantwort fehlen (IFN α β γ R $^{-/-}$), eine tödliche Erkrankung, bei der Enzephalitis, Vaskulitis, Meningitis, Hepatitis und Pneumonie auftreten (Karst et al., 2003). Andere murine Noroviren, die durch persistente Infektionen sowie eine verlängerte Virusausscheidung charakterisiert sind, wurden beschrieben (Hsu et al., 2006). Eine Beteiligung des Gastrointestinaltraktes wurde bislang nicht gezeigt.

2.2.3 Humane Sapoviren

Morphologisch typische Caliciviren beim Menschen wurden erstmals 1975 in England beschrieben (Madeley und Cosgrove, 1975). Der Prototyp-Stamm Sapporo Virus wurde 1977 im Zusammenhang mit einem Ausbruch akuter Gastroenteritis in einem Kinderheim in Sapporo/Japan entdeckt (Chiba et al., 1979). 1979 wurden Kotproben im Rahmen eines Gastroenteritisausbruches an einer Schule in London elektronen- und immunelektronenmikroskopisch untersucht, wobei eine morphologische Ähnlichkeit dieses Erregers mit den Caliciviren festgestellt wurde (Cubitt et al., 1979). Aufgrund der elektronenmikroskopisch typischen Morphologie wurden die Erreger zunächst als „*typical human caliciviruses*“ (Pringle, 1998), später als „*Sapporo-like viruses*“ (Green et al., 2000) bezeichnet. Seit 2002 trägt das Genus den Namen *Sapovirus* (Fauquet et al., 2005).

Sapovirusinfektionen können sich ebenfalls als akute Gastroenteritiden manifestieren, treten jedoch wesentlich seltener auf als Norovirusinfektionen. In der Mehrzahl der Fälle bleiben klinische Erkrankungen aus. Sapovirusinfektionen werden sowohl als sporadische Erkrankungen (Schuffenecker et al., 2001; Gallimore et al., 2006) als auch im Zusammenhang mit Ausbrüchen (Vinje et al., 2000a; Gallimore et al., 2006) beschrieben und treten meist bei Kindern unter fünf Jahren auf (Chiba und Nakata, 2000). Ältere Menschen können ebenfalls betroffen sein (Noel et al., 1997b). Eine saisonale Anhäufung wurde nicht beobachtet (Robinson et al., 2002). Auch bei Sapovirusinfektionen sind Diarrhöe, Erbrechen und Fieber typische Symptome, wobei das projektile Erbrechen fehlt (Simpson et al., 2003). Die Virusausscheidung dauert meist nur zwei Wochen an und ist somit kürzer als bei einer Norovirusinfektion (Rockx et al., 2002).

2.2.4 Animale Sapoviren

Animale Sapoviren umfassen das porcine enterale Sapovirus (Saif et al., 1980) sowie das enterale Sapovirus der Nerze (Guo et al., 2001a). Beide wurden aus Kotproben von an Diarrhöe erkrankten Tieren der entsprechenden Spezies isoliert.

Der Stamm Cowden des porcinen enteralen Sapovirus wurde bereits 1980 aus dem Kot eines 27 Tage alten Saugferkels mit Diarrhöe isoliert (Saif et al., 1980). Nach oraler Infektion gnotobiotischer Schweine mit Stuhlfiltrat dieses Tieres, welches auch Rotaviren und 23 nm große virusähnliche Partikel beinhaltete, konnte bei der Mehrzahl dieser Tiere Diarrhöe induziert und die Ausscheidung nachgewiesen werden. Histologisch trat eine Zottenatrophie im Jejunum auf. Hergestellte Antiseren zeigten keine Neutralisation eines Vertreters des Vesikularexanthemvirus (VESV) der Schweine. Die Calicivirus-ähnlichen Partikel reagierten nicht mit Antiseren gegen felines Calicivirus (FCV). 1988 ergab ein Infektionsversuch mit dem porcinen enteralen Calicivirus (PEC) und vier Tage alten gnotobiotischen Schweinen eine drei Tage p.i. beginnende, milde bis starke, etwa drei bis sieben Tage anhaltende Diarrhöe mit Zottenatrophie (Flynn et al., 1988). Erst 1999 konnte dieses Virus molekular charakterisiert werden (Guo et al., 1999). Es wird jetzt als porcines enterales Sapovirus bezeichnet (Fauquet et al., 2005).

In einem etwa 20 Jahre nach Entdeckung des PEC durchgeführten Tierversuch an vier bis sechs Tage alten gnotobiotischen Schweinen wurde die Pathogenese des zellkulturadaptierten PEC mit der des Wildtyps verglichen (Guo et al., 2001b). Hier kam es bei den mit dem Wildtyp infizierten Tieren (oral/intravenös) nach einer Inkubationszeit von zwei bis vier Tagen zu einer zwei bis fünf Tage anhaltenden milden Diarrhöe, während die mit dem zellkulturadaptierten PEC infizierten Tiere keine Diarrhöe entwickelten. Die Virusausscheidung dauerte bei beiden Gruppen sieben Tage an. Rasterelektronenmikroskopisch konnte bei intakter Mucosa eine Zottenatrophie in Duodenum und Jejunum gezeigt werden, die bei dem zellkulturadaptierten Virus mild verlief, im Falle des Wildtyp-Virus jedoch zu einer Fusion der Zotten führte und einen teilweise klinisch schweren Verlauf zeigte (Guo et al., 2001b). Histologisch konnten eine Zottenatrophie sowie eine Kryptenhyperplasie diagnostiziert werden. Durch Immunfluoreszenz ließen sich PEC-Antigene spezifisch in den Enterozyten der Zotten des proximalen Jejunums, jedoch nicht des Colons nachweisen. Interessant ist, dass der Nachweis von PEC RNS auch im Serum oral infizierter Schweine erfolgreich verlief und somit eine Virämie nachgewiesen werden konnte. Diese Versuche belegen, dass das porcine enterale Sapovirus nicht nur mit Diarrhöe assoziiert ist, sondern als primärer Durchfallerreger betrachtet werden kann.

1999 trat auf einer Nerzfarm im Norden der USA ein Ausbruch von Diarrhöe auf. Als Ursache wird eine Fütterung der Tiere mit rohen Schweinenieren und Schweinelebern diskutiert. Diese Annahme konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Zunächst erkrankten nur die älteren Nerze, später jedoch auch Jungtiere (fünf Wochen alt), die eine mehrere Tage anhaltende profuse Diarrhöe entwickelten. In den Kotproben der Tiere konnten unter Verwendung eines Hyperimmunserums gegen PEC im Elektronenmikroskop typische Calicivirus-Partikel gefunden werden. Nachfolgend wurden mit Hilfe einer RT-PCR, die ein breites Nachweisspektrum aufwies, Banden in der erwarteten Größe erhalten. Nach Klonierung, Sequenzierung und anschließenden phylogenetischen Analysen konnten die Erreger dem Genus Sapovirus zugeordnet werden (MEC = mink enteric calicivirus) (Guo et al., 2001a). MEC wird heute als enterales Sapovirus der Nerze bezeichnet (Fauquet et al., 2005).

2.3 Morphologie und Molekularbiologie von Noro- und Sapoviren

2.3.1 Morphologie

Die Virionen der Caliciviren bestehen aus einem ikosahedralen Kapsid mit 32 kelchförmigen Vertiefungen. Letztere sind für die Namensgebung verantwortlich (lateinisch calix = Kelch) und geben den Virionen in bestimmten Projektionen im elektronenmikroskopischen Bild ein Davidstern-ähnliches Aussehen. Bei Noroviren ist diese Struktur weniger deutlich ausgeprägt (Green, 2007). Caliciviren sind nicht behüllt, etwa 27-40 nm groß und besitzen eine T=3 ikosahedrale Symmetrie. Abb. 2 zeigt die typische sich im Elektronenmikroskop darstellende Calicivirus-Morphologie. Noroviren fehlt diese typische Morphologie; die Virionen zeigen elektronenmikroskopisch eine „gefiederte“ Oberfläche.

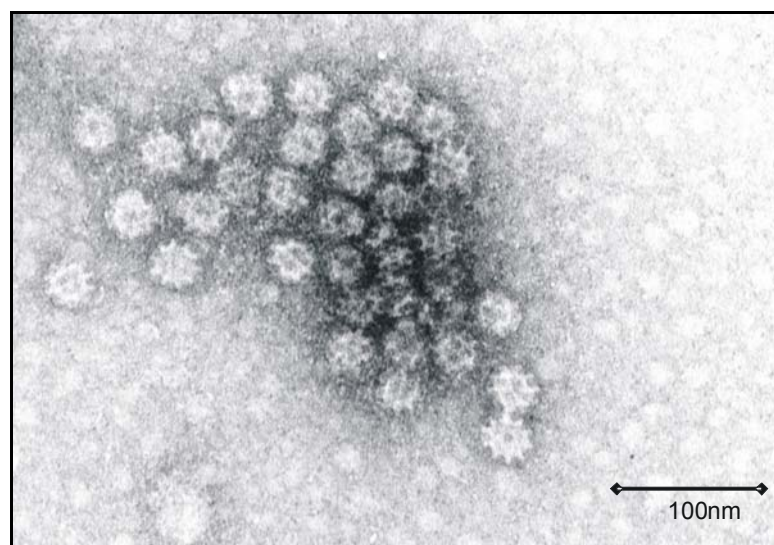


Abb. 2: Elektronenmikroskopisches Bild von Caliciviren.

Präparation aus der Leber eines Kaninchens. Negativkontrastierung (2% Methylaminowolframat). Balken: 100 nm. Foto M. König, Giessen.

Das Kapsid der Caliciviren besteht aus 90 Dimeren des Kapsidproteins VP1 und ein bis zwei Kopien des minoren Strukturproteins VP2 (Prasad et al., 1999). Die Struktur des Kapsids wurde durch kristallographische Studien untersucht, durch die zwei Domänen im Kapsid definiert werden konnten: die S-Domäne (shell = Schale) und die P-Domäne (protruding arm = vorstehender Arm). Die S-Domäne formt den inneren Teil des Kapsids, der das RNS-Genom umgibt, während die P-Domäne nach außen gerichtete bogenähnliche Kapsomere bildet (Green, 2007). Die S-Domäne besteht aus einem N-terminalen Arm (Aminosäuren (AS) 10 - 49 des VP1), der innerhalb der Schale liegt und der eigentlichen S-Domäne (AS 50 - 225), die diese Schale bildet. Die Aminosäuren 1-9 werden keiner Domäne zugeordnet. Die P-Domäne wiederum ist in die Subdomänen P1 (AS 226 - 278 sowie AS 406 - 520) und P2 (AS 279 - 405) unterteilt, wobei die P2-Subdomäne eine Insertion innerhalb der P1-Subdomäne darstellt. Die Aminosäuresequenz der P2-Subdomäne ist sehr variabel. P1 bildet die Seiten der Bögen der Kapsomere, P2 liegt exponiert auf der Spitze der Bögen. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 3) zeigt die Domänen des VP1 sowie eine schematische Abbildung des Kapsidaufbaus.

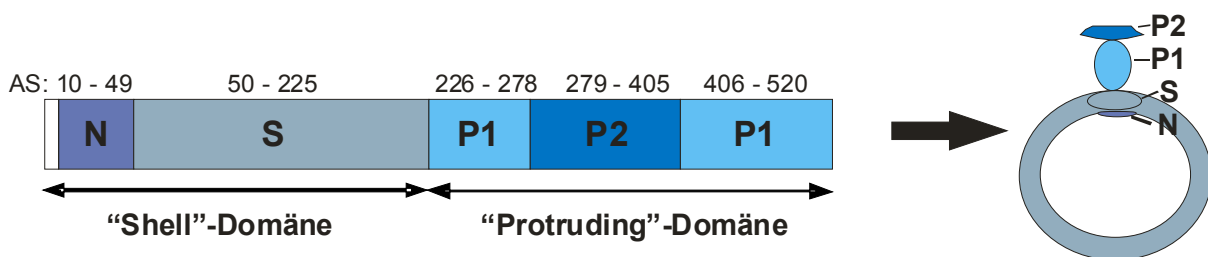


Abb. 3: Norwalk-Virus Kapsid als Beispiel für das VP1 von Caliciviren.

Nach Green (Green, 2007). Links: Domänen des VP1. N: N-terminaler Arm, S: S-Domäne (S: shell = Schale), P1 und P2: Subdomänen der P-Domäne (P: protruding arm = vorstehender Arm). Zahlen geben Aminosäurepositionen innerhalb des VP1 an. Rechts: Modell für die Anordnung der Domänen. Demnach bildet die S-Domäne den inneren Teil des Kapsids, welcher das RNS-Genom umgibt, die P-Domäne hingegen nach außen gerichtete, bogenähnliche Kapsomere.

2.3.2 Molekularbiologie

Das Genom der Noro- und Sapoviren besteht aus einer einzelsträngigen RNS positiver Polarität mit einer Länge von 7,4-7,7 Kilobasen (Kb), die am 3'-Ende polyadenyliert ist. Neben der genomischen RNS existiert eine 3'-coterminale subgenomische RNS von 2,2-2,4 Kb Länge, die für die Strukturproteine kodiert. Für Lago- und Vesiviren wurde gezeigt, dass diese ebenfalls in Virionen verpackt wird (Meyers et al., 1991; Neill, 2002). Ein Virusprotein (VPg) ist kovalent an das 5'-Ende von genomischer und subgenomischer RNS gebunden (Meyers et al., 1991; Daughenbaugh et al., 2003). Einer sehr kurzen 5'-terminalen nichttranslatierten Region folgen in Richtung 3'-Terminus die Nichtstrukturproteingene, die Strukturproteingene, eine 3'-nichttranslatierte Region sowie ein Poly-A-Schwanz am 3'-Ende.

Die Nichtstrukturproteine NS1 bis NS7 weisen Bereiche auf, die in bestimmten Sequenzmotiven und in ihrer Anordnung denen der Picornaviren stark ähneln; dazu gehören 2A (NS1), 2B (NS2), die 2C-Helikase (NS3), 3A (NS4), 3B (NS5), die 3C-Proteinase (NS6) und 3D-RNS-abhängige RNS-Polymerase (NS7) (Nomenklatur der Proteine nach Green (Green, 2007)). Sie werden autokatalytisch durch die 3C-ähnliche Cystein-Proteinase (NS6) prozessiert (Blakeney et al., 2003), die zur Gruppe der Trypsin-ähnlichen Proteinasen gehört (Clarke und Lambden, 2000). Die proteolytische Aktivität ist auch in trans bereits nachgewiesen worden (Seah et al., 2003); die kristallographische Struktur der Protease des Norwalk Virus zeigt eine Zwei-Domänen-Struktur ähnlich der bei anderen viralen Cystein-Proteinasen mit einer katalytischen Trias aus His30, Glu54 und Cys139 (Zeitler et al., 2006).

Die bisher bekannten Funktionen der übrigen viralen Proteine sind folgende: Das N-terminale Protein (p48) (NS1-2) der Noroviren ist nach Expression als Fusionsprotein in Zellen in der Lage, an intrazelluläre Vesikel zu binden, einen Komplex mit zellulären Proteinen zu bilden und so den intrazellulären Proteintransport zu unterbrechen (Ettayebi und Hardy, 2003; Fernandez-Vega et al., 2004). Es ist zusätzlich assoziiert mit dem Abbau des Golgi-Komplexes in transfizierten Zellen (Fernandez-Vega et al., 2004).

Die NTPase (p41) (NS3) ist eine Nukleinsäure-unabhängige Nukleosid-Triphosphatase (Helikase) (Pfister und Wimmer, 2001). Die Funktion des Nichtstrukturproteins NS4 („3A-ähnliches Protein“) ist unbekannt. Bei Vesiviren ist es in membranösen Replikationskomplexen anwesend (Green, 2007).

Das kovalent mit dem Genom verbundene Virusprotein (VPg) (NS5) wird in Virionen nachgewiesen. Es spielt vermutlich eine Rolle in der Initiation der Translation (Herbert et al., 1997), da es an den Initiationsfaktor eIF3 bindet (Daughenbaugh et al., 2003). Außerdem ist das VPg essentiell für die Infektiosität: Für das zum Genus *Vesivirus* gehörende Primaten-Calicivirus Pan-1 konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Proteinase K die Infektiosität der RNS aufheben kann (Dunham et al., 1998).

Die RNS-abhängige RNS-Polymerase (NS7) ist für die Synthese der Nukleinsäuren verantwortlich (Matrize für die Virussynthese und subgenomische RNS) (Modrow et al., 2003) und ist sowohl Poly-A- als auch Primer-unabhängig (Fukushi et al., 2004).

Das Hauptstrukturprotein VP1 bildet wie zuvor beschrieben das Kapsid der Virionen (Green, 2007). Ein weiteres Strukturprotein ist das basische Strukturprotein VP2 (isoelektrischer Punkt > 10,0) (Glass et al., 2000a). Vermutlich wird in vivo die Stabilität des VP1 durch das VP2-Protein reguliert, da gezeigt werden konnte, dass bei rekombinanter Expression die Quantität der VLPs dadurch erhöht wird, dass es diese stabilisiert und vor dem Verdau durch Proteasen schützt (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Der hohe Anteil

basischer Aminosäuren dieses Proteins lässt vermuten, dass es die RNS bindet (Glass et al., 2000a). VP1 und VP2 werden ausgehend von einer VPg-gebundenen subgenomischen RNS synthetisiert, welche ORF2 und ORF3 enthält (Hardy, 2005). Wie genau die Translation des ORF, der für das VP2 kodiert, von statten geht, ist bisher nicht geklärt. Für das VP2 existiert keine kodierende separate mRNS und keine IRES (internal ribosome entry site). Meyers definierte einen Termination-Reinitiations-Mechanismus, durch den VP2 von der bicistronischen RNS translatiert wird (Meyers, 2003).

2.3.2.1 Genomorganisation der Noroviren

Das Genom der Noroviren ist in drei ORFs organisiert. Der 5'-terminal gelegene ORF1 kodiert für ein großes Polyprotein, welches posttranslational durch die 3C-ähnliche Cystein-Proteinase autokatalytisch in sechs Proteine prozessiert wird: NS1-2 (p48 (N-terminales Protein)), NS3 (p41 (NTPase/Helikase)), NS4 („3A-ähnliches Protein“), NS5 (VPg), NS6 (3C-Proteinase) und NS7 (3D-Polymerase) (Norwalk Virus) (Belliot et al., 2003).

ORF2 kodiert für das Hauptstrukturprotein VP1. ORF1 und ORF2 überlappen sich je nach Genogruppe um einige Nukleotide, was zu einer Verschiebung des Leserasters führt (Clarke und Lambden, 2000). ORF3 kodiert für ein kleineres Strukturprotein VP2 (Glass et al., 2000a), überlappt mit dem ORF2 und liegt dadurch wieder im gleichen Leseraster wie ORF1 (Clarke und Lambden, 2000). Der Genomaufbau und die Spaltprodukte des ORF1 sind in der folgenden Grafik am Beispiel des Norwalk Virus dargestellt:

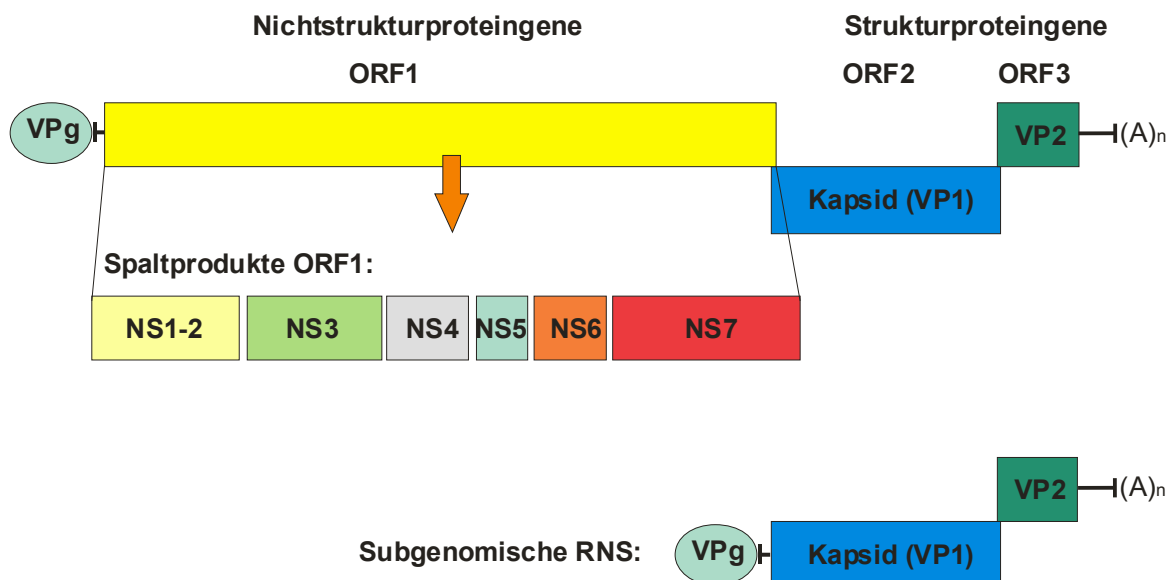


Abb. 4: Genomorganisation und Spaltprodukte des ORF1 von Noroviren.

Erläutert am Beispiel von Norwalk Virus (Belliot et al., 2003; Hardy, 2005; Green, 2007). Das ORF1-Polyprotein wird posttranslational durch die 3C-ähnliche Cystein-Proteinase (NS6) in die Nichtstrukturproteine gespalten. ORF2 kodiert für das Strukturprotein VP1, ORF3 für das Strukturprotein VP2. NS: Nichtstrukturproteingene.

2.3.2.2 Genomorganisation der Sapoviren

Das Genom der Sapoviren ist ebenfalls in drei ORFs organisiert. Der 5'-terminale ORF1 kodiert für die Nichtstrukturproteine sowie, im Unterschied zu den Noroviren, für das Kapsidprotein VP1. Oka et al. beschrieben 2005 erstmals die proteolytische Prozessierung des ORF1, für die auch hier die virale 3C-ähnliche Cystein-Proteinase verantwortlich ist (Oka et al., 2005). Dabei ist das Cystein an Position 1.171 im „GDCG“-Motiv von entscheidender Bedeutung für die proteolytische Aktivität. Die resultierenden Spaltprodukte des ORF1 sind: NS1, NS2, NS3 (NTPase/Helikase), NS4, NS5 (VPg), NS6-7 (Pro-Pol) und VP1. Eine weitere Spaltung des Pro-Pol-Produktes in Proteinase und RNS-abhängige RNS-Polymerase wurde nicht beobachtet. Es scheint sich dabei wie auch nach in vitro Translation bei Lagoviren (RHDV) (Martin Alonso et al., 1996) und Vesiviren (FCV) (Sosnovtseva et al., 1999) um ein stabiles Produkt zu handeln. Für RHDV konnten jedoch nach Infektion von Hepatozytenkulturen Proteinase und RNS-abhängige RNS-Polymerase getrennt nachgewiesen werden (König et al., 1998). ORF2 kodiert für ein basisches Strukturprotein, welches dem ORF3-Produkt der Noroviren entspricht. Ein dritter ORF innerhalb der für das Kapsidprotein kodierenden Region, jedoch in einem anderen Leseraster liegend, kodiert wie ORF2 für ein kleines basisches Protein (Clarke und Lambden, 2000; Oka et al., 2005). Die folgende Abbildung zeigt die Genomorganisation der Sapoviren sowie die Spaltprodukte des ORF1 am Beispiel von Hu/SaV/Mc10/2000/Thailand:

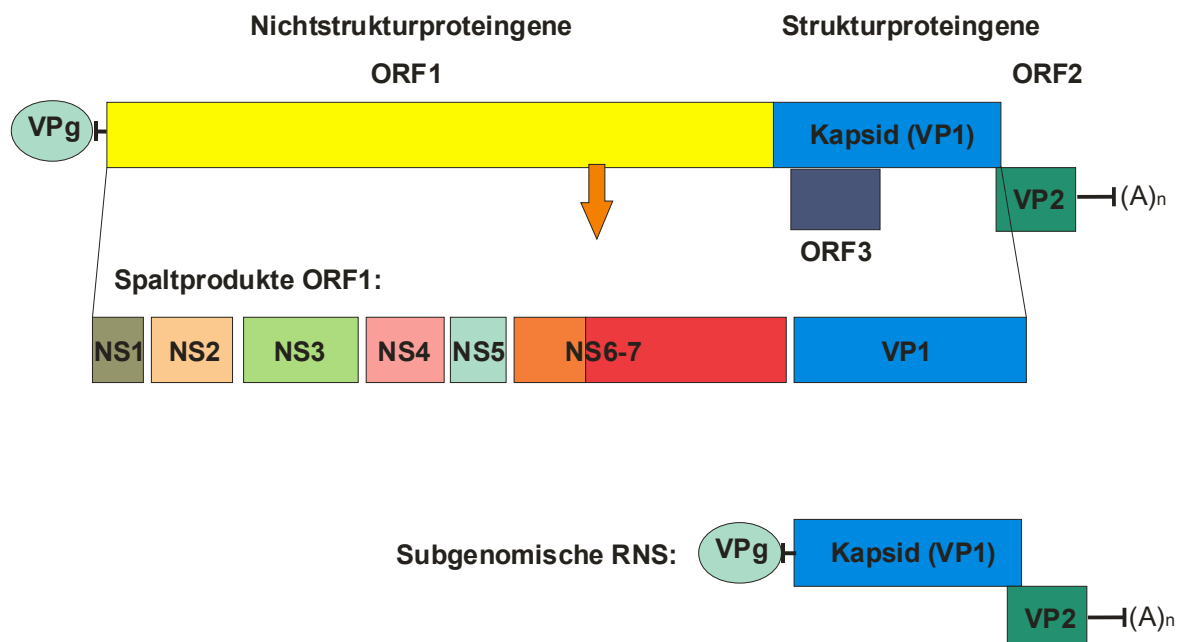


Abb. 5: Genomorganisation und Spaltprodukte des ORF1 von Sapoviren.

Erläutert nach Oka am Beispiel des Isolates Hu/SaV/Mc10/2000/Thailand (Oka et al., 2005; Green, 2007). Der 5'-terminale ORF1 kodiert für die Nichtstrukturproteine sowie, im Unterschied zu den Noroviren, für das Kapsidprotein VP1. Die Prozessierung des ORF1 erfolgt ebenfalls posttranslational durch die 3C-ähnliche Cystein-Proteinase (NS6). ORF2 kodiert für das Strukturprotein VP2. Ein dritter ORF innerhalb der für das Kapsidprotein kodierenden Region, jedoch in einem anderen Leseraster liegend, kodiert für ein kleines basisches Protein. NS: Nichtstrukturproteine.

2.3.3 Rekombination

Wenn zwei verschiedene Viren die selbe Zelle infizieren, kann dies zu einer genetischen Rekombination und so zur Bildung neuer Viren führen. Bei RNS-Viren wurden hauptsächlich der Mechanismus des so genannten „Template Switch“ beschrieben, bei dem es während der viralen Replikation durch die RNS-abhängige RNS-Polymerase zu Dissoziation, Reassoziierung und Reinitiation der RNS-Synthese kommt (Gallei, 2005). Eine weitere Möglichkeit der Rekombination ist die so genannte „breakage and ligation“, bei der es nach Spaltung eines oder beider Replikationspartner zu einer Ligation und somit zu einem „neuen“ RNS-Molekül kommt (Gallei, 2005).

Rekombinationen sind häufige Ereignisse bei Noro- und Sapoviren, wobei die Rekombination meist zwischen Vertretern einer Genogruppe auftritt. Der Ort der Rekombination liegt dabei meist zwischen Polymerase und Kapsid (Katayama et al., 2004; Ambert-Balay et al., 2005). Rekombinationsorte wurden jedoch auch innerhalb des Kapsidgens detektiert, beispielsweise zwischen P1- und P2-Subdomäne sowie innerhalb der P2-Subdomäne (Rohayem et al., 2005). Innerhalb der Genogruppe III der Noroviren (bovine Noroviren) konnten bereits Rekombinanten zwischen Genotyp 1 (Jena Virus) und 2 (Newbury agent 2) gezeigt werden (Han et al., 2004; Oliver et al., 2004). Auch innerhalb der Genogruppe III der Sapoviren traten Rekombinationen auf (Wang et al., 2005b).

Die Möglichkeit neuer speziesübergreifender Rekombinanten in Genogruppe II der Noroviren kann nicht ausgeschlossen werden (Wang et al., 2005a), da in dieser Genogruppe sowohl die Mehrzahl humaner Norovirus-Isolate als auch die porcinen Noroviren eingeordnet sind. Auch eine Rekombination zwischen Vertretern unterschiedlicher Genogruppen innerhalb eines Genus konnte bereits gezeigt werden. Dabei handelte es sich um Vertreter der Genogruppen II und IV der Sapoviren (Hansman et al., 2005b).

2.4 Übertragungswege

Größere Ausbrüche, insbesondere von Norovirusinfektionen, treten hauptsächlich in Heimen, Krankenhäusern, Restaurants (Riordan et al., 1984; Svensson, 2000) oder bei Festen, auf denen Speisen und Getränke gereicht werden, in Schulen und Kindergärten (Gallimore et al., 2004a) sowie auf Kreuzfahrtschiffen (Widdowson et al., 2004) auf.

Bei der direkten Infektion mit Noro- und Sapoviren erfolgt die Übertragung über erkrankte Personen sowie asymptomatisch infizierte Ausscheider (Schmierinfektion). Dabei wird das Virus sowohl durch direkten Kontakt als auch indirekt, z.B. über Erbrochenes, übertragen (Greenberg et al., 1979). Eine aerogene Infektion über die explosionsartige Emesis

(Tröpfcheninfektion) (Simpson et al., 2003) oder Verbreitung über mit Vomit kontaminierte Oberflächen ist möglich (Patterson et al., 1997).

Daneben hat auch die indirekte Infektion über Lebensmittel oder Wasser eine große Bedeutung. Im Vordergrund stehen kontaminierte Lebensmittel wie z.B. Austern und andere Schalentiere (Le Guyader et al., 2006), Bäckereiprodukte (Kuritsky et al., 1984; Friedman et al., 2005), Salat (Holtby et al., 2001), Obst (Le Guyader et al., 2004), Gemüse (Butot et al., 2007), Sandwiches (Gunn et al., 1982; Morgan et al., 1994) u.a. oder fäkal kontaminiertes Wasser. Die Kontamination der Lebensmittel kann wiederum durch kontaminiertes Wasser oder infizierte Lebensmittelbearbeiter erfolgen (Koopmans et al., 2003), so dass Ausbrüche meist das Ergebnis verschiedener Übertragungswege sind (Rockx, 2004). Da weniger als 100 Viruspartikel für eine Infektion ausreichend sind, haben Noroviren eine hohe Transmissionsrate (Glass et al., 2000b). Die Virusausscheidung asymptomatisch infizierter Personen spielt insbesondere bei der Bearbeitung von Lebensmitteln eine große Rolle (Glass et al., 2000b).

Noro- und Sapoviren können lange Zeit in der Umwelt infektiös bleiben. Abwasser (Loisy et al., 2000; Lodder und de Rouda Husman, 2005; Pusch et al., 2005), Oberflächenwasser (Lodder und de Rouda Husman, 2005; Pusch et al., 2005), Trinkwasser (Kukkula et al., 1999), Meereswasser (Griffin et al., 2003) und auch Grundwasser (Fout et al., 2003) wurden auf enterale Viren untersucht; in allen diesen Wasserarten konnten Noroviren gefunden werden.

Inwieweit eine Übertragung über landwirtschaftliche Nutztiere erfolgen kann, ist bislang nicht geklärt. Eine Übertragung von Caliciviren zwischen Wirtsspezies wurde bislang nur für Vesiviren beschrieben, kann aber für Noro- und Sapoviren nicht ausgeschlossen werden (Rockx, 2004). Abb. 6 zeigt schematisch die Infektionswege beim Menschen und bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

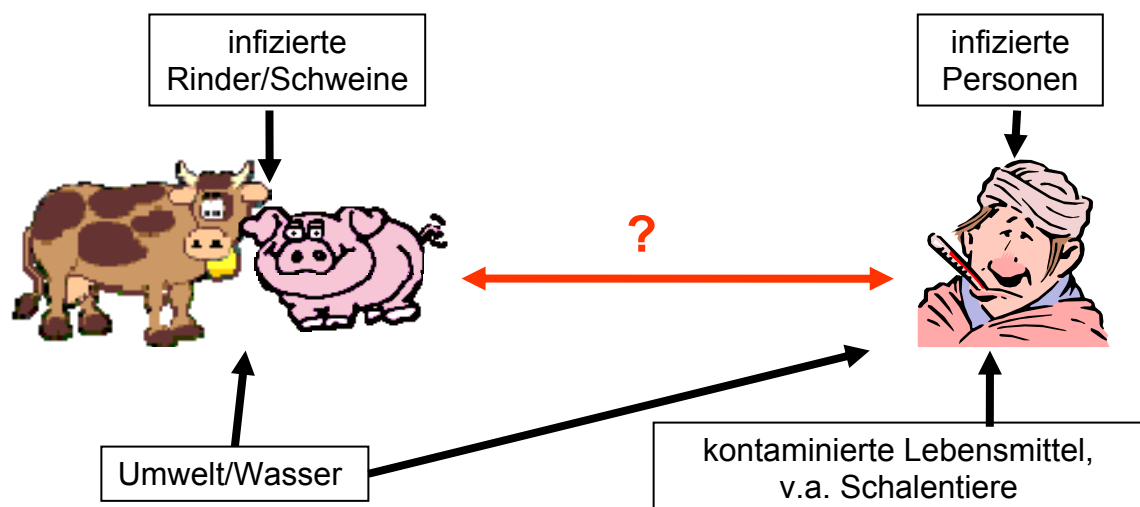


Abb. 6: Übertragungswege für Calicivirusinfektionen beim Menschen und bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Der rote Pfeil zwischen landwirtschaftlichen Nutztieren und dem Menschen weist auf die bisher ungeklärte Fragestellung einer Übertragung von Noro- und Sapoviren zwischen Tier und Mensch hin.

2.5 Immunität gegenüber Noro- und Sapovirusinfektionen

2.5.1 Antikörper

Antikörper werden meist gegen exponierte Regionen von Virionen gebildet. Die hypervariable P2-Subdomäne spielt bei Noro- und Sapoviren eine wichtige Rolle in Bezug auf die Antigenität. Kristallographische Studien des Kapsids von Vesiviren zeigten, dass Epitope, die Neutralisation vermitteln, auf drei hoch-variablen Schleifen am distalen Teil der P-Domäne sitzen und eine Region umgeben, die konservierte, wirtsspezifische Bereiche enthält (Chen et al., 2006). Ferner wurden bei Noroviren die 74 C-terminalen Aminosäuren des Kapsids in der P1-Subdomäne als breit-reaktives Epitop definiert, das bei der Mehrzahl von Vertretern der Genogruppe I, jedoch nicht bei Genogruppe II vorkommt (Hale et al., 2000). Dieses Epitop wurde zunächst als linear betrachtet; nach einer neuen Studie wird jedoch eine konformationelle Komponente als verantwortlich für die Genogruppen-Spezifität des Epitops vermutet (Parker et al., 2005).

Eine Studie aus England untersuchte die antigenetische Verwandtschaft zwischen den bovinen enteralen Caliciviren Jena (GGIII/1) und Newbury agent-2 (GGIII/2). Ein Antikörper gegen ein kreuzreaktives Epitop, das am N-Terminus des VP1 innerhalb des Kapsids lokalisiert ist, erkannte sowohl GGIII/1 als auch GGIII/2 sowie GGII/3. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Jena Virus und Newbury agent-2 zu zwei unterschiedlichen antigenetischen Typen oder Serotypen gehören, da im ELISA gegen heterologe VLPs keine Kreuzreaktion nachgewiesen werden konnte (Oliver et al., 2006b).

Graham et al. führten 1994 eine Studie an 51 Personen durch, denen Stuhlfiltrat oral zugeführt wurde (Graham et al., 1994). Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits bestehende Antikörpertiter keine protektive Immunität gewährleisten. Personen, die Erbrechen als Symptom zeigten, bildeten höhere Antikörpertiter aus als solche ohne Erbrechen. In Versuchen war ein 6-14 Wochen andauernder Schutz gegen das gleiche Virus nachweisbar (Wyatt et al., 1974). Das Fehlen einer langandauernden Immunität kann zur wiederholten Infektion mit dem gleichen Stamm führen; weiterhin verursacht die große Heterogenität viele antigenetische Typen, so dass nach Infektion kein Schutz vor einer Erkrankung mit anderen Stämmen vorliegt (Glass et al., 2000b). Andererseits kann mitunter ein langandauernder Schutz nachgewiesen werden, der in Versuchen bis zu 34 Monate andauern kann (Green, 2007). Diese Unterschiede in der Empfindlichkeit konnten bisher nicht erklärt werden.

2.5.2 Genetische Faktoren

Histo-Blutgruppenantigene (HBGA) sind komplexe Kohlenhydrate, die auf der Oberfläche von roten Blutzellen und Epithelzellen des Respirations-, Urogenital- und Digestionstraktes sowie an freien Oligosacchariden von Körperflüssigkeiten wie Speichel, Darminhalt, Milch und Blut vorhanden sind. Die drei wichtigsten HBGA-Familien sind neben dem AB0-Blutgruppensystem der Sekretor-Status und das Lewis-System (Tan und Jiang, 2005b). Sekretoren sind solche Personen, die ihre Blutgruppen-Antigene nicht nur auf ihren Blutzellen, sondern auch in anderen Körperflüssigkeiten sowie auf der Oberfläche epithelialer Zellen des Darmes exprimieren. Etwa 80% der Europäer sind Sekretoren. Der Sekretor-Status wird durch die α -1,2-Fukosyltransferase (FUT2) reguliert (Nicht-Sekretoren sind FUT2 -/-). Nicht-Sekretoren sind hoch resistent gegenüber symptomatischen Infektionen mit der Mehrzahl der Norovirus-Stämme. Im Versuch konnte gezeigt werden, dass Norovirus VLPs an die Darmoberfläche von Sekretoren, jedoch nicht an die von Nicht-Sekretoren binden (le Pendu et al., 2006).

Die α -1,4-Fukosyltransferase (FUT3), auch Lewis-Enzym genannt, ist verantwortlich für die Anlagerung eines Fukosylrestes an das N-Acetyl-Glukosamin der Vorläufersubstanz. Die Lewis-Blutgruppen sind ein System aus löslichen Glykolipiden im Serum, die sich sekundär an Erythrozyten anlagern. Individuen mit homozygot inaktivierten FUT3-Allelen (FUT3 -/-) werden als „Lewis negativ“ bezeichnet. Norwalk Virus VLPs banden im Versuch an Lewis Antigene (Hutson et al., 2003).

Zudem sind Menschen mit Blutgruppe 0 empfänglicher für Infektionen mit Norwalk Virus (Hutson et al., 2002).

Von großer Bedeutung für Noroviren als „erfolgreiche Parasiten“ des Gastrointestinaltraktes ist, dass unterschiedliche Noroviren verschiedene HBGA mit einem möglichen großen Spektrum an Wirten erkennen (Tan und Jiang, 2005b).

2.6 Diagnostik von Noro- und Sapovirusinfektionen

2.6.1 Klinisches Bild

Bis heute sind für das Vorliegen einer Norovirusinfektion beim Menschen die klinisch-epidemiologischen Parameter gültig, die von Kaplan bereits 1982 aufgestellt wurden (Kaplan et al., 1982a):

- mittlere Inkubationszeit 24-48 Stunden
- mittlere Erkrankungsdauer 12-60 Stunden
- kein Labornachweis bakterieller oder parasitärer Erreger (Stuhlproben)
- Vomitus bei über 50% der betroffenen Personen.

2.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zu Beginn stand der elektronenmikroskopische Nachweis von Viruspartikeln im Vordergrund, der bald durch die Immunelektronenmikroskopie, ermöglicht durch den Einsatz von Rekonvaleszentenseren, ergänzt wurde (Kapikian et al., 1972; Madeley, 1979; Dolin et al., 1982). Bei der Festphasen-Immunelektronenmikroskopie besteht aufgrund der Bindung von Viruspartikeln an auf dem Trägernetz befindliche Antikörper und daraus resultierender Aggregatbildung eine bessere Nachweismöglichkeit. Diese Methode wird bis heute angewandt (Tajiri-Utagawa, 2004), ist aber aufgrund der niedrigen Sensitivität und der Notwendigkeit eines erfahrenen Untersuchers in den Hintergrund getreten (Glass et al., 2000b). Auch ein in das Elektronenmikroskop eingebautes automatisiertes Partikelsuchsystem (Utagawa et al., 2002) hat sich nicht durchgesetzt.

2.6.3 Zellkultursysteme

2.6.3.1 Noroviren

Humane, bovine und porcine Noroviren können bislang nicht auf Zellkultur angezüchtet werden. Obwohl in einigen Studien verschiedene Zelllinien zur Etablierung eines Zellkultursystems, insbesondere für humane Noroviren, studiert wurden (Duizer et al., 2004b), konnte bislang kein Erfolg verzeichnet werden.

Einzig das murine Norovirus 1 (MNV-1) kann auf Vero-Zellen angezüchtet werden, zeigt jedoch keinen zytopathischen Effekt (Wobus et al., 2006). Da die Symptomatik der MNV-1-Infektion keinerlei gastrointestinale Symptome einschließt, ist dieses Modell als Zellkultursystem für humane Norovirusinfektionen nicht geeignet.

2.6.3.2 Sapoviren

Versuche, humane Sapoviren auf Zellkultur zu vermehren, blieben bislang ebenfalls erfolglos. Das porcine enterale Calicivirus (PEC) hingegen konnte bereits 1988 zum ersten Mal erfolgreich fortlaufend auf primären porcinen Nierenzellen (PPK-Zellen) vermehrt werden (Flynn und Saif, 1988). Dazu musste dem Zellkulturmedium Darminhalt (intestinal contents preparation (ICP)) zugegeben werden. In einer Studie von Parwani wurde das PEC an eine kontinuierliche porcine Nierenzelllinie (LLC-PK, proximales Tubulusepithel) adaptiert. Auch hierbei musste dem Medium ICP (erhalten von nicht-infizierten gnotobiotischen Schweinen) zugegeben werden. Versuche, ICP durch verschiedene intestinale Enzyme porcinen Ursprungs oder bakterielle Proteasen zu ersetzen, schlugen fehl (Parwani et al., 1991). 2004 untersuchten Chang et al. die Rolle des ICP und fanden heraus, dass Gallensäuren (glycochenodeoxycholsche oder taurochenodeoxycholsche Säure) als aktive Faktoren im ICP essentiell für die Vermehrung des PEC sind. Gallensäuren sind Moleküle, die im Darm an den Orten der Virusreplikation vorhanden und

am zellulären Signalübertragungsweg der Proteinkinase-A (Chang et al., 2002) und einer möglichen Down-Regulierung der angeborenen Immunantwort beteiligt sind (Chang et al., 2004).

Zu bemerken ist jedoch, dass das zellkulturadaptierte PEC einige Mutationen gegenüber dem Wildtyp aufweist (eine stille Mutation im Bereich der Protease, zwei Aminosäureaustausche und eine stille Mutation im Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase sowie fünf Nukleotidaustausche im Bereich des Kapsids, die in vier Aminosäureaustauschen sowie einer stillen Mutation resultieren) (Guo et al., 1999).

2.6.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Das Kapsidprotein VP1 der Caliciviren hat die Eigenschaft, selbsttätig zu virusähnlichen Partikeln, sogenannten VLPs, zu aggregieren, wenn es im Baculovirussystem oder anderen heterologen Systemen exprimiert wird. Diese sind den nativen Virionen morphologisch und antigenetisch sehr ähnlich, was man sich für die Verwendung von VLPs als Antigene in verschiedenen Testverfahren zunutze macht. So wurden VLPs beispielsweise für die Entwicklung von enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) verwendet. Zur Generierung von VLPs hat sich das Baculovirusexpressionssystem aufgrund der folgenden Vorteile bewährt:

- es besitzt eine hohe Expressionseffizienz für eukaryotische rekombinante Proteine
- es findet ein Selbstzusammenbau des viralen Kapsides in virusähnliche Partikel statt
- und nachfolgend deren Sezernierung in den Zellkulturüberstand (Guo et al., 2001c).

Mit Hilfe dieser VLPs können einerseits Antikörper gegen native Viruspartikel beispielsweise in Meerschweinchen (Guo et al., 2001c) oder Mäusen (Kitamoto et al., 2002) produziert werden; sie können andererseits jedoch auch als Antigen verwendet werden, so dass sie sowohl zur Entwicklung von Antigen-ELISAs als auch Antikörper-ELISAs von Nutzen sind, die im folgenden näher beschrieben sind.

Deletionsversuche zeigten, dass eine Verkürzung des N-terminalen Endes der S-Domäne um 20 AS sowie interne Deletionen in der P-Domäne keinen Einfluß auf die Bildung von VLPs hatte, die nur in ihrer Größe (38 – 45 nm) variierten. Auch C-terminale Deletionen von bis zu 300 AS wurden toleriert. Keine VLPs wurden gebildet, wenn mehr als 20 AS des N-Terminus deletiert wurden (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002).

2.6.4.1 Antigen-ELISA

Bei den Antigen-ELISAs ist die ELISA-Platte mit Antikörpern besetzt, an die das in der Probe enthaltene Antigen binden soll. Dieses wird nachfolgend mittels eines enzymkonjugierten Antikörpers detektiert.

Eine Vielzahl von Antigen-ELISAs wurde auf der Basis von Reagentien, die mit Hilfe von VLPs gewonnen wurden, zur Detektion humaner Noroviren (Kobayashi et al., 2000) sowie humaner Sapoviren (Nakata et al., 1988; Hansman et al., 2006) aus Stuhlproben entwickelt. Derzeit befinden sich zwei kommerziell erhältliche Antigen-ELISAs auf dem Markt, die Noroviren in humanen Stuhlproben nachweisen können (Richards et al., 2003; Burton-MacLeod et al., 2004).

Auch zur Detektion des bovinen Norovirus Jena wurde ein Antigen-ELISA entwickelt (Deng et al., 2003).

2.6.4.2 Antikörper-ELISA

Beim Antikörper-ELISA wird die ELISA-Platte meist mit Antigen beschichtet, an das die in der Probe enthaltenen Antikörper binden. Diese werden mit einem spezie-spezifischen Sekundärantikörper nachgewiesen.

Eine Vielzahl an Antikörper-ELISAs wurde zur Detektion der Seroprävalenz humaner Noroviren (Gray et al., 1993; Brinker et al., 1998; Cubitt et al., 1998; Brinker et al., 1999; Jing et al., 2000; Nicollier-Jamot et al., 2003) und Sapoviren (Nakata et al., 1988) entwickelt.

Zum Nachweis von Antikörpern gegen das porcine enterale Sapovirus wurde bereits ein VLP-ELISA mit im Baculovirussystem exprimiertem VP1-Protein entwickelt (Guo et al., 2001c). Auch Antikörper gegen bovine Noroviren der Genotypen 1 (Jena) (Deng et al., 2003) und 2 (186-OH) wurden mit Hilfe von Antikörper-ELISAs detektiert (Han et al., 2005).

2.6.5 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

Die Klonierung und Sequenzierung der Genome von Norwalk Virus und Southampton Virus erlaubte die Entwicklung von Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion-Assays, durch deren Einführung der Durchbruch in der Diagnostik von Noro- und Sapovirusinfektionen gelang (de Leon et al., 1992; Jiang et al., 1992a; Moe et al., 1994; Jiang et al., 1995).

Die Mehrzahl der verwendeten Primer liegen im 5'-terminalen (Wang et al., 1994; Ando et al., 1995; Green et al., 1995a; Green et al., 1995b; Le Guyader et al., 1996; Vinje und Koopmans, 1996; Jiang et al., 1999) oder 3'-terminalen Bereich (Fankhauser et al., 2002) des RNS-abhängigen RNS-Polymerasegens sowie in den hochkonservierten 5'-terminalen (Green et al., 1995b; Noel et al., 1997a; Vinje et al., 2000b; Kojima et al., 2002) oder 3'-terminalen Bereichen des Kapsidgens (Vinje et al., 2004).

Dabei werden zum einen RT-PCRs mit breit reagierenden Primern eingesetzt, die alle Genogruppen der jeweiligen Genera oder sogar Noro- und Sapoviren detektieren können

(Jiang et al., 1999; Vinje et al., 2000a). Aufgrund der hohen Heterogenität sind hierbei stark degenerierte Primer notwendig (Vinje et al., 2004).

Zum anderen werden aber auch PCRs mit Primern verwendet, die eine hohe Spezifität besitzen und die einzelnen Genogruppen unterscheiden können (Kawamoto et al., 2001; Yuen et al., 2001; Smiley et al., 2003).

Auch sogenannte nested-PCR-Systeme finden in der Diagnostik von Noro- und Sapovirusinfektionen Anwendung (Honma et al., 2001; Yuen et al., 2001; Medici et al., 2005). Der Vorteil einer nested („verschachtelten“) PCR besteht darin, dass das Template einer ersten PCR für eine zweite PCR verwendet wird, und zwar mit Primern, die sich innerhalb des amplifizierten Genombereiches befinden. Dadurch kann man sowohl geringere Template-Mengen nachweisen als auch „falsche“ Produkte der ersten PCR ausselektieren.

Mit Hilfe der RT-PCR werden neben Kotproben auch Lebensmittel (Schwab et al., 2000; Sair et al., 2002b) und Wasserproben (Schwab et al., 1996; Fout et al., 2003; Griffin et al., 2003) auf das Vorhandensein von Noroviren kontrolliert. Dies wird speziell nach Erkrankungsausbrüchen durchgeführt, um das ursächliche Agens zu detektieren und Übertragungswege aufzudecken (Sair et al., 2002a).

Seit kurzem wird auch die Real Time RT-PCR zur Untersuchung verdächtiger Kotproben angewandt (Richards et al., 2004a; Gunson und Carman, 2005). Dabei werden zum einem Fluorochrome (z.B. SYBR[®] Green) unspezifisch in die Windungen der Doppelhelix der amplifizierten DNS eingebaut (Richards et al., 2004b), zum anderen werden aber auch fluorochrom-markierte Sonden verwendet, die sequenzspezifisch an die amplifizierte DNS binden (Kageyama et al., 2003; Hoehne und Schreier, 2006).

Die RT-PCR Tests werden zur Verbesserung von Sensitivität und Spezifität anhand neu erworbener Sequenzdaten stetig weiterentwickelt. Der Datenaustausch sowie Ringversuche finden im Rahmen von internationalen Verbundprojekten statt (Vinje et al., 2003).

2.7 Epidemiologische Studien

2.7.1 Humane Noro- und Sapoviren

Weltweit wurde eine Vielzahl epidemiologischer Studien durchgeführt, um Daten über die Virus- und Antikörperprävalenz in der Bevölkerung zu erhalten, beispielsweise in England (Robinson et al., 2002), Deutschland (Schreier et al., 2000; Oh et al., 2003), den Niederlanden (Koopmans et al., 2000), Thailand (Hansman et al., 2004b), Australien (Hansman et al., 2003) und den USA (Fankhauser et al., 1998; Widdowson et al., 2004; Chan et al., 2006). Eine 1999 veröffentlichte Studie schätzt, dass humane Noroviren jährlich etwa 23 Millionen Erkrankungen in den USA verursachen. Davon werden 9,2 Millionen Fälle durch Lebensmittelinfektionen verursacht, was etwa 67% aller Lebensmittel-bedingten Gastroenteritiden ausmacht. 50.000 betroffene Menschen müssen jährlich stationär aufgenommen werden (Mead et al., 1999). Diese Zahlen unterstreichen die Notwendigkeit des Schutzes vor den Folgen einer Infektion, beispielsweise durch eine Impfung.

Der Nachweis von Noroviren der Genogruppe II ist häufiger als der von Viren aus der Genogruppe I (Fankhauser et al., 1998; Maguire et al., 1999), was dadurch erklärt werden kann, dass die Virusmenge bei Vertretern der Genogruppe II im Kot infizierter Personen über 100 Mal höher ist als in Stuhlproben mit Erregern der Genogruppe I (Chan et al., 2006). Vor allem der Lordsdale Virus Genotyp (Genotyp II/4) ist weltweit vorherrschend (Widdowson et al., 2004); derzeit setzt sich jedoch weltweit eine neue Variante des Genotyp II/4 durch (Bull et al., 2006; Phan et al., 2006).

2.7.2 Animale Noro- und Sapoviren

Die folgenden Tabellen fassen die bei Rindern und Schweinen bis Frühjahr 2007 publizierten epidemiologischen Studien zusammen:

Seroprävalenz: (Seroprävalenz = Zahl der antikörperpositiven Tiere x 100 geteilt durch die Größe der untersuchten Population)

Land/Jahr	Bovines Norovirus	Porzines Norovirus	Porzines enterales Sapovirus	Referenz
Deutschland 2003	99,1% (824) (ELISA)	-	-	(Deng et al., 2003)
Japan 1997-2003	-	36% (266) (ELISA)	-	(Farkas et al., 2005)
USA 2003	-	71% (110) (ELISA)	-	(Farkas et al., 2005)

Tab. 2: Seroprävalenz boviner und porziner Noro- und Sapoviren.

Die hinter den Prozentzahlen angegebene Zahl in Klammern gibt die Anzahl der untersuchten Proben an. Das jeweils gewählte Untersuchungsverfahren ist ebenfalls angegeben.

Virus-Prävalenz: (Prävalenz = Zahl aller nachgewiesenen Infektionsfälle x 100 geteilt durch die Größe der untersuchten Population)

Land/Jahr	Bovines Norovirus	Porzines Norovirus	Porzines enterales Sapovirus	Referenz
Belgien	6,9% (317) (RT-PCR)	-	-	(Scipioni et al., 2004)
Brasilien	-	2,2% (138) (RT-PCR)	22,5% (138) (RT-PCR)	(Lyman et al., 2004)
Costa Rica	-	0% (23) (RT-PCR)	17,4% (23) (RT-PCR)	(Lyman et al., 2004)
Deutschland 2003	8,9% (381) (Ag-ELISA)	-	-	(Deng et al., 2003)
Deutschland	4,9% (41) (RT-PCR)	-	-	(Ike et al., 2007)
Großbritannien 1998-2000	8% (476) 0% (114) (RT-PCR)	-	-	(Oliver et al., 2003)
Italien	9,6% (249) (RT-PCR)	-	-	(Santoni et al., 2004)
Japan	-	0,4% (1117) (RT-PCR)	-	(Sugieda et al., 1998)
Japan 2002-2003	-	4,2% (24) (RT-PCR)	37,5% (24) (RT-PCR)	(Yin et al., 2006)
Korea 2001-2002	-	-	8,8% (102) 0%(60 gesunde Schweine) (RT-PCR)	(Kim et al., 2006)
Korea 2004-2005	9,3% (645) (RT-PCR)	-	-	(Park et al., 2007)
Niederlande 1997-2000	32% (243) Kälber 4% (312) Milchvieh (RT-PCR)	-	-	(van der Poel et al., 2003)
Niederlande 1998-1999	33% (75) Kälber 0% (43) Milchvieh (RT-PCR)	2% (100) (RT-PCR)	-	(van der Poel et al., 1996)
Slowenien	-	6% (unbekannt) (RT-PCR)	-	(Poljsak-Prijatelj et al., 2004)
Ungarn 2005	-	5,9% (17) (RT-PCR)	11,7% (17) (RT-PCR)	(Reuter et al., 2007)
USA	-	17,2% (29) (RT-PCR)	3,4% (29) (RT-PCR)	(Lyman et al., 2004)
USA 2003	-	0% (117) (ELISA, RT-PCR)	-	(Farkas et al., 2005)
USA 1999-2003	-	1,9% (377) (RT-PCR)	2,4% (377) (RT-PCR)	(Wang et al., 2005b)
USA 2000	1% (99) 80% (25 Pools, Verlaufsproben) (RT-PCR)	-	-	(Smiley et al., 2003)

Land/Jahr	Bovines Norovirus	Porzines Norovirus	Porzines enterales Sapovirus	Referenz
USA 2002	70% (36 Pools) 74% (39 Pools) (RT-PCR)	-	-	(Smiley et al., 2003)
USA	80% (60) 28,6% (14) (RT-PCR)	-	-	(Wise et al., 2004)
Venezuela 1994-2000	0,8% (129) (RT-PCR)	-	-	(Alcala et al., 2003)
Venezuela 1993-2003	-	-	18% (204) (RT-PCR)	(Martinez et al., 2006)

Tab. 3: Virus-Prävalenz boviner und porziner Noro- und Sapoviren.

Die hinter den Prozentzahlen angegebene Zahl in Klammern gibt die Anzahl der untersuchten Proben an. Das jeweils gewählte Untersuchungsverfahren ist ebenfalls angegeben. Die Jahreszahl hinter dem Namen des Landes gibt die Jahreszahl an (wenn erhältlich), aus der die untersuchten Proben stammen.

2.7.2.1 Bovines Norovirus

Untersuchungen zur Prävalenz boviner Noroviren wurden weltweit durchgeführt; die angegebenen Werte liegen dabei zwischen 0% und 80%. Außer in einer Studie an Kotproben von Rindern aus Deutschland auf der Basis eines ELISAs mit Jena Virus-VLPs (Deng et al., 2003) wurde die RT-PCR als diagnostisches Verfahren gewählt. Die höchste Prävalenz wurde in einer Studie aus den USA festgestellt: Dabei wurden 60 Proben von fünf bis vierzehn Tage alten Kälbern von acht Farmen in Wisconsin untersucht. Die beprobten Tiere litten alle unter Diarrhöe. Davon waren 80% positiv in der RT-PCR (Wise et al., 2004). Insgesamt konnten in Proben von Kälbern häufiger Noroviren detektiert werden als in Proben älterer Tiere.

Zur Seroprävalenz liegt nur eine Studie aus Deutschland vor, in der 99,1% der Tiere positiv auf Antikörper gegen Jena Virus getestet wurden (Deng et al., 2003).

2.7.2.2 Porzines Norovirus

Porzine Noroviren konnten insgesamt seltener detektiert werden. Die Prävalenzen lagen hier zwischen 0% und 6%. Nur in einer Untersuchung wurde eine höhere Prävalenz festgestellt: Lyman et al. untersuchten die Verbreitung porziner Caliciviren in Amerika. Dabei waren unter anderem 17,2% von 29 Proben aus den USA (North Carolina) positiv in der RT-PCR (Lyman et al., 2004).

Serologische Untersuchungen zeigten 36% bzw. 71% Seroprävalenz gegen porzine Noroviren in Japan und den USA (Farkas et al., 2005).

2.7.2.3 Porzines enterales Sapovirus

Die bislang zur Prävalenz porziner enteraler Sapoviren durchgeführten Studien basieren alle auf RT-PCR Untersuchungen, bei denen Prävalenzen zwischen 0% (gesunde Schweine) und 37,5% (2/3 erkrankte Tiere) liegen. Aus Europa liegt nur eine Veröffentlichung über eine Untersuchung in Ungarn vor (Reuter et al., 2007). Zur Seroprävalenz wurden bisher keine Studien veröffentlicht.

2.8 Prävention und Bekämpfung

Die hohen Zahlen nachgewiesener bzw. geschätzter Norovirusinfektionen unterstreichen die Notwendigkeit des Schutzes vor Erkrankungen, beispielsweise durch eine Impfung. Besonders in den USA besteht ein reges Interesse an einer Vakzine, u.a. aufgrund der Kosten, die Norovirusinfektionen durch den Ausfall von Arbeitnehmern verursachen. Auch die ungünstigen Auswirkungen eines Ausbruches auf Operationen des Militärs nehmen die Amerikaner sehr ernst; so wurden aus dem Stuhl von während der Operation Wüstensturm im Rahmen des Golfkrieges an Gastroenteritis erkrankten Soldaten zwei Norovirus-Isolate isoliert, die als „Desert Shield“-Viren bezeichnet wurden (Lew et al., 1994). Auch auf Kriegsschiffen und auf Kreuzfahrtschiffen treten vermehrt Gastroenteritiden auf (Riddle et al., 2006). Bisher gibt es keine kommerziell verfügbare Vakzine.

Die gegenwärtigen Schutzmaßnahmen bestehen in der Infektionsprophylaxe sowie Desinfektionsmaßnahmen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

2.8.1 Symptomatische Therapie

Die Behandlung von Noro- und Sapovirusinfektionen beschränkt sich bei Mensch und Tier meist auf eine symptomatische Therapie. So wird beispielsweise der Flüssigkeitsverlust durch orale oder parenterale Elektrolytgaben ausgeglichen und der Durchfall durch Antidiarrhöika gestoppt. Ferner werden beim Menschen Antiemetika gegen das explosionsartige Erbrechen verabreicht.

2.8.2 Prophylaxe

Da ein Impfstoff zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erhältlich ist, beschränkt sich die Prophylaxe gegen Infektionen mit Noro- und Sapoviren auf die Vermeidung der Kontamination von Lebensmitteln und Wasser sowie einer Vermeidung der Ausbreitung nach Ausbrüchen (König et al., 2004). Dies geschieht durch konsequente Hygienemaßnahmen, die in Richtlinien festgehalten werden und beispielsweise durch das US-amerikanische Center of Disease Control (CDC) (Parashar et al., 2001), das deutsche Referenzlabor am Robert-Koch-Institut (Anonymus, 2005) oder auch das hessische Sozialministerium (Anonymus, 2004) veröffentlicht werden. Da die minimale Infektionsdosis

bei weniger als 100 infektiösen Virionen pro Individuum liegt (Höhne und Schreier, 2000), wird die Einhaltung dieser Richtlinien zur Vermeidung einer Weiterverbreitung dringend angeraten.

Der Nachweis von Noroviren in humanen Stuhlproben unterliegt in Deutschland der Meldepflicht nach §7 des Infektionsschutzgesetzes.

Auf Europa-Ebene hat sich ein Konsortium („Foodborne Viruses in Europe Group“) von zwölf Laboratorien aus neun Ländern zusammengeschlossen, um neue standardisierte Detektionsmethoden zu entwickeln und Daten auszutauschen. Dabei stehen insbesondere die Diversität von Noroviren und die Ursachenforschung sowie die Bedeutung von Risiken im Vordergrund (Koopmans et al., 2003).

2.8.3 Impfung

2.8.3.1 Art der Impfstoffe, Zielgruppen

Aufgrund des Fehlens eines Tiermodells stammen Informationen zur Immunität bei Norovirusinfektionen des Menschen aus Studien mit Freiwilligen, die mit Norovirus-haltigem Stuhlfiltrat infiziert wurden (Dolin et al., 1971; Wyatt et al., 1974; Thornhill et al., 1975; Graham et al., 1994). Dabei wurde gezeigt, dass Testpersonen, die wiederholt mit dem Antigen infiziert wurden, Antikörpertiter ausbildeten, die vor einer Erkrankung schützten (Johnson et al., 1990).

Die Idee zu den aktuellen Ansätzen der Impfstoffentwicklung bei Noroviren lieferte 1994 die erfolgreiche Immunisierung von Kaninchen mit im Baculovirussystem exprimiertem Kapsid des Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV), das nach intramuskulärer Applikation zu einer starken humoralen Immunantwort führte und Kaninchen ab dem fünften Tag nach Applikation vor Erkrankung schützte (Laurent et al., 1994).

Die bisher in der Entwicklung befindlichen Impfstoffe basieren auf VLPs, die im Baculovirussystem (Estes et al., 1997), aber auch in Pflanzen wie z.B. Kartoffeln (Tacket, 2005), Tomaten (Huang et al., 2005) oder Tabak exprimiert werden können (Mason et al., 1996).

Zielgruppen für eine Impfung sind insbesondere ältere Menschen, Kinder, Schwangere, Reisende, immunsupprimierte Personen sowie das Militär (Estes et al., 2000).

2.8.3.2 Impfversuche

2.8.3.2.1 Maus

Adulte weibliche CD1- und BALB/c-Mäuse wurden oral mit im Baculovirus-Expressionssystem hergestellten rekombinanten Norwalk Virus VLPs (mit und ohne Cholera-toxin als Adjuvans) immunisiert (Ball et al., 1998). Die Mäuse zeigten sowohl im Serum eine IgG-Antwort als auch die Ausbildung einer intestinalen IgA-Immunität. Guerrero

et al. immunisierten Mäuse oral oder intranasal mit rekombinanten Norwalk Virus VLPs (Guerrero et al., 2001). Intranasal immunisierte Mäuse zeigten ebenfalls die Ausbildung einer systemischen sowie auch einer lokalen Immunantwort (intestinal, vaginal); dabei waren geringere Antigenmengen als bei der oralen Gabe notwendig.

2.8.3.2.2 Kalb

Auch gnotobiotische Kälber wurden bereits mit bovinen Norovirus-VLPs immunisiert. Sie erhielten zwei bis drei Dosen VLPs (250 µg/Dosis) in einer öligen Formulierung, mit modifiziertem E. coli Toxin (mLT) oder in immunstimulierenden Komplexen (ISCOM) (Han et al., 2006). Die Inokulation erfolgte in verschiedenen Gruppen intranasal, intramuskulär und/oder oral. Tiere, die VLPs mit Öl oder mLT intranasal oder intramuskulär erhielten, bildeten Serum IgG-Antikörper aus. Serum IgA-Antikörper wurden nur durch intramuskuläre Administration mit Öl, intranasale Administration mit mLT bzw. orale Gabe erreicht. Intestinale IgA-Antikörper wurden nur bei Tieren gefunden, die intranasal mit VLPs und mLT vakziniert wurden. Diese Tiere zeigten nach Challenge-Versuchen einen partiellen Schutz mit verzögerter und verkürzter Diarrhöe. Virusausscheidung war nach Challenge in allen vakzinierten Gruppen zu finden. Nach Rekonvaleszenz waren bei allen Kälbern hohe intestinale IgA-Antikörper zu finden.

2.8.3.2.3 Mensch

Klinische Phase-I-Studien mit oral verabreichten rekombinanten Norwalk VLPs am Menschen haben gezeigt, dass die Betroffenen nach Challenge sowohl Serum-IgG als auch Serum-IgA Antikörpertiter ausbilden (Ball et al., 1999). Der Versuch der Detektion intestinaler IgA-Antikörper war bisher nicht erfolgreich (Ball et al., 1999; Estes et al., 2000).

2.8.4 Desinfektion

Caliciviren besitzen als unbehüllte Viren eine vergleichsweise hohe Tenazität und überstehen mehrere Wochen in der Umwelt. Ferner überstehen sie bis zu 10 ppm des zur Trinkwasserdesinfektion verwendeten Chlorids (Keswick et al., 1985) sowie Erhitzen auf bis zu 60°C und bleiben auch gefroren lange stabil (Glass et al., 2000b).

Eine Inaktivierung von Caliciviren konnte am Beispiel von felinem Calicivirus (FCV), caninem Calicivirus (CaCV) sowie einem Norovirus-Isolat durch nicht-ionisierende Strahlung (UV-Strahlung) und ionisierende Strahlung (Gammastrahlung) gezeigt werden (de Rouda Husman et al., 2004). Die gleiche Arbeitsgruppe beschreibt weiter eine Verminderung des Virustiters durch thermische Inaktivierung (71,3°C (Pasteurisations-Temperatur) für eine Minute: 3 log₁₀, 20°C für eine Woche: 3 log₁₀), Ethanol-Inaktivierung (70% Ethanol für 30 Minuten: 3 log₁₀) sowie eine pH-Inaktivierung (FCV: 5 log₁₀ bei pH < 2 oder > 10). Eine komplette Inaktivierung (> 5 log₁₀) konnte für FCV und CaCV bei

Chloridkonzentrationen von über 3.000 ppm nach 30 Minuten erreicht werden (Duizer et al., 2004a).

2.9 Noro- und Sapoviren als Zoonoseerreger?

Englische Forscher haben 2005 eine Risikoeinschätzung des zoonotischen Potentials von Tierkrankheiten durchgeführt; das dort auch erwähnte bovine Norovirus wird von den Autoren jedoch in Level 0 eingestuft (Level 0: not zoonotic bis Level 4: confirmed zoonosis) (Palmer et al., 2005). Im Gegensatz dazu gibt es auch Argumente für die Möglichkeit eines zoonotischen Potentials von Noro- und Sapoviren:

2.9.1 Virusnachweis/Rekombination

Die Detektion von animalen (bovine Noroviren, porcine Noroviren, porcine enterale Sapoviren) und humanen enteralen Caliciviren in Austern (Costantini et al., 2006) zeigt einen möglichen Übertragungsweg animaler Caliciviren auf den Menschen. Allerdings konnten animale enterale Caliciviren bisher nicht in humanen Stuhlproben gefunden werden.

Porcine Noroviren lassen sich in Genogruppe II der Noroviren nahe zu humanen Isolaten eingruppierten. Nach Wang kann die Möglichkeit der Entstehung neuer Rekombinanten mit erweitertem Wirtsspektrum in Genogruppe II der Noroviren nicht ausgeschlossen werden (Wang et al., 2005a).

Hansmann et al. beschrieben zum ersten Mal eine Rekombination zwischen Vertretern verschiedener Genogruppen, nämlich der Genogruppen II und IV der Sapoviren und wiesen auch auf die Möglichkeit einer Rekombination mit Vertretern der Genogruppe III (porzines enterales Sapovirus) hin (Hansman et al., 2005b). Dies könnte zur Bildung neuer Virusstämme führen, für die sowohl Mensch als auch Tier empfänglich sind.

2.9.2 Antikörpernachweis

Antikörper gegen bovine Noroviren konnten in Serumproben von Tierärzten und der allgemeinen Bevölkerung in den Niederlanden nachgewiesen werden (Widdowson et al., 2005), die mit Hilfe eines ELISAs auf der Basis von Norovirus-ORF2 enthaltenden VEE (Venezuelan Equine Encephalitis)-Replikons untersucht wurden. Die Prävalenz von IgG-Antikörpern war bei der Gruppe der Tierärzte mit 28% signifikant höher als in der Kontrollgruppe (20%). Eine Kreuzreaktivität mit humanen Noroviren kann jedoch nach Angaben der Autoren nicht ausgeschlossen werden. Eine andere Studie von Han et al., die sich mit dem Zusammenbau von rekombinanten Kapsidproteinen in VLPs und der Evaluierung der Kreuzreaktivität zwischen bovinen und humanen Noroviren beschäftigte, konnte eine Kreuzreaktivität zwischen humanen und bovinen Noroviren nicht nachweisen (Han et al., 2005).

Auch konnten in Serumproben von Schweinen Antikörper gegen humane Noroviren detektiert werden. Interessanterweise waren die Antikörpertiter gegen Vertreter der Genogruppe I (Norwalk Virus) höher als gegen Vertreter der Genogruppe II (Hawaii Virus), obwohl das porcine Norovirus der Genogruppe II zuzuordnen ist (Farkas et al., 2005). Auch wenn eine heterologe Immunantwort gegen verschiedene antigenetische Typen dabei nicht ausgeschlossen werden kann, und die Ergebnisse dieser Studie weiterer Untersuchungen bedürfen, unterstreichen sie die Möglichkeit eines speziesübergreifenden Vorkommens von enteralen Caliciviren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), <i>Bos taurus</i>	American Type Culture Collection (ATCC CCL-22)
SFT-R (Sheep Fetal Thymus)	SFT-R/CCL-5 Rie043: von Dr. Riebe (Institut für Diagnostische Virologie, BFAV, Insel Riems, Deutschland) zur Verfügung gestellt
BEL-26 (Bovine Embryonic Lung)	erhalten von B. Makoschey, Fa. Intervet
SF-21 (<i>Spodoptera frugiperda</i> , Ovarialzellen)	von T. Lengsfeld, BFAV Tübingen, zur Verfügung gestellt
<i>E. coli</i> K12 JM109	kompetente <i>E. coli</i> Zellen; Institut für Virologie, Giessen
TOP 10 chemisch kompetente <i>E. coli</i>	Fa. Invitrogen

3.1.2 Viren und Antikörper

Bac-N-Blue® DNS Autographa californica multiple-embedded nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), linearisierte DNS	Fa. Invitrogen
humane Norovirus RNS (Kotsuspension)	von E. Duizer, M. Koopmans, B. Rockx, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Diagnostic Laboratory for Infectious Diseases and Perinatal Screening (LIS), Bilthoven, Niederlande, zur Verfügung gestellt
humane Sapovirus RNS (Kotsuspension)	von J. Rohayem, Universität Carl-Gustav-Carus, Dresden, zur Verfügung gestellt
rPEC (rekombinantes porcines enterales Sapovirus (Stamm Cowden) Kapsid); Zellkulturüberstand	von L. Saif, Food Animal Health Research Program, Department of Veterinary Preventive Medicine, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University, Wooster, USA, zur Verfügung gestellt
humanes polyklonales Rekonvaleszentenserum gegen humane Noroviren	von E. Duizer, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Diagnostic Laboratory for Infectious Diseases and Perinatal Screening (LIS), Bilthoven, Niederlande, zur Verfügung gestellt
QIAexpress® Maus α -penta-His Antikörper (IgG1)	Fa. Qiagen
Peroxidase-konjugierter Ziege α -Maus Antikörper (IgG)	Fa. Dianova
Peroxidase-konjugierter Ziege α -Schwein Antikörper (IgG)	Fa. Dianova
Cy3-markierter Ziege α -Kaninchen cy3 Antikörper(IgG)	Fa. Dianova

3.1.3 Probenmaterial

3.1.3.1 Probenentnahme

Von März 2003 bis April 2006 wurden Kotproben, Organproben (Darmmaterial) sowie Serumproben von Rindern, Schweinen und kleinen Wiederkäuern (Schafe, Ziegen) zur Durchführung dieser Studie gesammelt. Dabei handelte es sich zum einen um Probenmaterial, welches im Zusammenhang mit der Verteilung von Fragebogen unter Tierärzten stand. Zum anderen wurden Kotproben von Rindern, die zur elektronenmikroskopischen Untersuchung an das diagnostische Labor des Instituts für Virologie, FB10, der JLU Giessen, gesandt wurden, sowie Darmmaterial, welches zur weiterführenden virologischen Diagnostik aus dem pathologischen Institut, FB 10, JLU Giessen, eingesandt wurde, in die Studie mit einbezogen. Die Sammlung der Proben unterlag keiner statistischen Methode.

Das Hauptaugenmerk bei der Auswahl der Proben lag auf Jungtieren, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme an Diarrhöe litten, sowie solchen Tieren, die aus Beständen stammten, in denen anamnestisch eine Diarrhöe-Problematik festgestellt wurde. Zusätzlich wurden jedoch auch Proben von Tieren anderer Altersstufen sowie von solchen ohne Diarrhöe einbezogen.

Des Weiteren wurden Kotproben von Tieren, die nicht den Nutztieren zuzuordnen sind, untersucht. Dabei wurden jedoch nur Tiere mit Diarrhöe berücksichtigt. Folgende Spezies waren vertreten: Affe, Alpaka, Ameisenbär, Antilope, Bongo, Damwild, Elch, Elefant, Ente, Frettchen, Hund, Kamel, Katze, Okapi, Tapir, Tiger, Pferd und Wisent.

Eine Auflistung aller untersuchten Proben zeigt die nachfolgende Tabelle 4:

	Kotproben (Fragebogen)	Kotproben (Einsendungen)	Organproben (Einsendungen)	Gesamt
Rind	83	361	102	546
Schwein	125	5	2	132
Kleine Wiederkäuer (Schaf, Ziege)	9	23	0	32
Andere Tierarten	1	18	1	20

Tab. 4: Auflistung der gesammelten Proben nach Tierarten.

Innerhalb der Tierarten wurde eine weitere Einteilung in eingesandte Proben und Proben, die im Rahmen der Fragebogenaktion gesammelt wurden, getroffen.

3.1.3.2 Herkunft des Probenmaterials

Das Probenmaterial stammt zum größten Teil aus Deutschland; es sind jedoch auch Proben aus dem europäischen Ausland in die Studie mit einbezogen worden. Die Mehrzahl der Proben stammt aus Hessen. Eine geographische Verteilung der Herkunft der aus

Deutschland stammenden Kot- und Organproben zeigt Abb. 7. Die genaue Herkunft ist den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

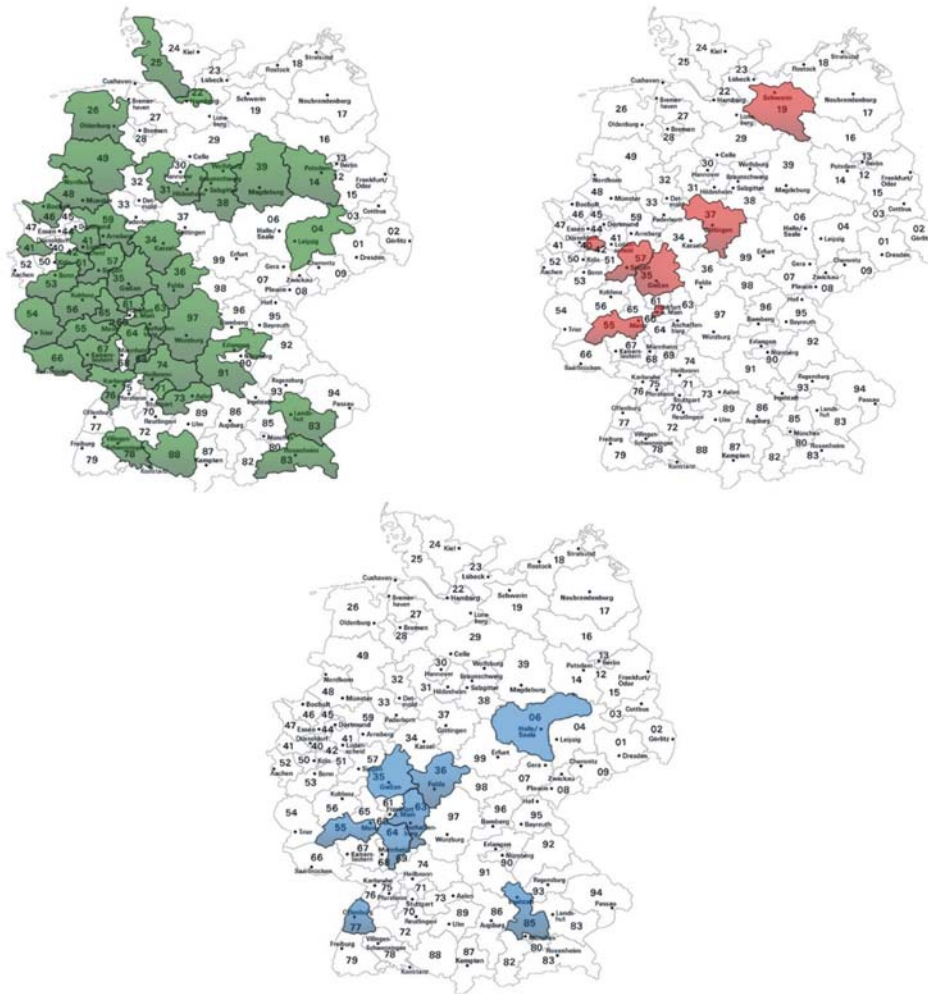


Abb. 7: Geographische Verteilung der Herkunft der in dieser Arbeit untersuchten Kot- und Organproben. Die Einteilung erfolgte hier nach den Postleitzahlengebieten der Bestände. Grün: Proben von Rindern, rot: Proben von kleinen Wiederkäuern, blau: Proben von Schweinen.

3.1.3.3 Fragebogen

Für jede Probe wurde ein Fragebogen ausgefüllt. Ein Beispiel ist in Abb. 8 zu sehen. Neben Informationen über den Bestand (Größe, Haltungsform, Bestandsprobleme,...) wurden Informationen über die einzelnen Tiere erfragt (Alter, Rasse, Anamnese,...). Auch hier sind die detaillierten Ergebnisse im Anhang tabellarisch aufgelistet.

Probenentnahme					
Datum: ____ . ____ . 200__					
Tierarzt/Klinik: _____					
Name und Anschrift des Tierbesitzers: _____					
Tierart: Rind <input type="checkbox"/> Schwein <input type="checkbox"/> sonstige _____					
Rasse: _____					
Betriebsform: Mast <input type="checkbox"/> Zucht <input type="checkbox"/> Aufzucht <input type="checkbox"/> Milchvieh <input type="checkbox"/> sonstiges _____					
Angaben zum Bestand: Bestandsgröße: _____					
Tiere					
Einzelhaltung <input type="checkbox"/> Gruppenhaltung <input type="checkbox"/>					
Spaltenboden <input type="checkbox"/> Einstreu <input type="checkbox"/>					
sonstiges _____					
Stallhaltung <input type="checkbox"/> Weidegang <input type="checkbox"/>					
Probleme mit: Anorexie <input type="checkbox"/> Vomitus <input type="checkbox"/>					
Diarrhoe <input type="checkbox"/> keine Probleme <input type="checkbox"/>					
sonstiges _____					

Tier	Kennzeichnung	Kot- probe Röhrchen Nr.	Serum- probe Röhrchen Nr.	Alter in Monaten	Geschlecht
1					♀ <input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/>
2					♀ <input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/>
3					♀ <input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/>
4					♀ <input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/>
5					♀ <input type="checkbox"/> ♂ <input type="checkbox"/>

Tier	Klinik				
	Anorexie	Vomitus	Diarrhoe	Keine Probleme	Sonstige Symptome
1					
2					
3					
4					
5					

Abb. 8: Fragebogen bei Probennahme.

Neben Informationen über den Gesamtbestand wurden detaillierte Informationen über die einzelnen Tiere gesammelt.

3.1.3.4 Statistische Auswertung

Nach Abschluß der Versuche wurden die Ergebnisse mit Unterstützung durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen mit Hilfe des Statistikprogrammpaketes BMPD, Release 7.0 (Dixon, 1993), statistisch ausgewertet. Einzelne, sich anschließende Berechnungen erfolgten mit den Programmen TESTIMATE6 (Rahlf, 2002), BiAS für Windows (Ackermann, 2003) sowie StatXact-Turbo (Mehta und Patel, 1992).

Die Fragebögen wurden tabellarisch zusammengefasst und auf Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen einer Infektion mit Noro- oder Sapoviren und anderen Faktoren (z.B. das Alter oder das Symptom Durchfall) untersucht. Die Untersuchung dieser „rohen“ Zusammenhänge wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (Zahlenwerte, z.B. Alter) bzw. des t-Testes sowie des exakten Testes nach Fisher (ja-nein-Unterscheidung, z.B. Durchfall oder kein Durchfall) durchgeführt. Der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt; d.h. Ergebnisse, deren p-Werte $\leq 0,05$ lagen, wurden als statistisch signifikant angesehen (Lorenz, 1996).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Parameter wurde mit dem Programm „MS-Excel“ von Microsoft durchgeführt.

3.1.4 Enzyme und Enzympuffer

Biotherm Polymerase 5 U/μl	Fa. NaTuTec
Human Placenta RNase Inhibitor Out 40 U/μl	Fa. Invitrogen
Puffer K (Restriktionsverdau)	Fa. TaKaRa
Puffer M (Restriktionsverdau)	Fa. TaKaRa
Restriktionsendonukleasen (BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, XhoI)	Fa. New England Biolabs (NEB), Pharmacia, Promega, Stratagene, TaKaRa
Superscript II RNase H reverse Transkriptase 200 U/μl	Fa. Invitrogen
Trypsin 1:250	Fa. Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Fa. TaKaRa
T4-Ligase Puffer	Fa. TaKaRa

3.1.5 Vorgefertigte Medien und Systeme ("Kits")

BC Assay: protein quantification kit	Fa. Uptima
Baculovirus Transfer Vektor pBlueBacHis2 A	Fa. Invitrogen
Bac-N-Blue Transfektionskit	Fa. Invitrogen
DNA-Sequenzierungs-Kit „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“	Fa. Amersham
SF900II-Medium	Fa. Invitrogen
SF900 1,3 x Medium	Fa. Invitrogen
QIAquick Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen
QIAprep Miniprep Kit	Fa. Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Fa. Qiagen
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Fa. Qiagen
QIAGEN One Step RT-PCR Kit	Fa. Qiagen
TOPO TA Cloning Kit	Fa. Invitrogen

3.1.6 Chemikalien und Reagenzien

1 Kb DNS-Größenmarker	Fa. Invitrogen
100 Bp DNS-Größenmarker	Fa. Invitrogen
Acrylamid	Fa. Fluka
Agar-Agar	Fa. Difco
Agarose (Elektrophorese)	Fa. Gibco-BRL
AgarPlaquePlus® Agarose	Fa. BD Biosciences Pharmingen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Fa. AmpliChem
Ampicillin	Fa. Serva
Bacto-Trypton	Fa. Difco
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Gibco-BRL
Bromphenolrot	Fa. Sigma
Dimethylsulfid (DMSO)	Fa. Sigma
Desoxynukleotide	Fa. Roth
Ethidiumbromid (10 mg/ml Ethidiumbromid Stammlösung)	Fa. Roth
Glycin	Fa. Roth
Harnstoff (Ultra pure)	Fa. United States Biochemical
Methylaminwolframat	Fa. Plano
β-Mercaptoethanol	Fa. Merck
Octylglykosid	Fa. Fluka
Penicillin/Streptomycin	Fa. Sigma
Phenolrot	Fa. Riedel-de Haen AG

Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fa. ICN
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fa. Boehringer Mannheim
Tris	Fa. Boehringer Mannheim
Triton X-100	Fa. Fluka
Trypanblau	Fa. Serva
Tween-20	Fa. Fluka
„Ultra Pure Sequa Gel Complete“ Puffer	Fa. National Diagnostics

Weitere, nicht extra aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Bioscience, BRL, Fluka, Merck, Pharmacia, Sigma, Serva und Roth bezogen.

3.1.7 Allgemeine Medien und Puffer

Ca/Mg-Lösung	0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 1,16 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1,15 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 950 ml Aqua dd gelöst, autoklaviert, bei 4°C gelagert
PBS defizient	0,8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 1,15 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 950 ml Aqua dd gelöst, autoklaviert, bei 4°C gelagert
PBS ⁺⁺	950 ml PBS defizient mit Zusatz von 50 ml Ca/Mg-Lösung

3.1.8 Medien und Puffer für Zellkultur

Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zellen	10% (v/v) DMSO in FKS
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Insektenzellenmedium	1 l SF900II-Medium, 2 ml Penicillin/Streptomycin (500x), 200 µl Amphotericin (500x), bei 4°C gelagert
Penicillin/Streptomycin 500x	50.000 UI/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat; in Aqua dd gelöst; sterilfiltriert (0,1 µm) und bei -20°C gelagert
Trypanblau-Lösung	0,25% (w/v) Trypanblau, 0,15 M NaCl in Aqua dd, filtriert (0,2 µm), bei 4°C gelagert
Trypsin-Lösung	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g/l Trypsin, 1:300, 0,16 g/l Phenolrot in Aqua dd gelöst, sterilfiltriert (0,1 µm), bei 4°C gelagert
Zellkulturmedium CCM-34	4,5 g/l DMEM-Pulver, 200 µM L-Alanin, 225 µM L-Aspartat, 933 µM Glycin, 510 µM L-Glutamat, 217 µM L-Prolin, 184 µM Hypoxanthin, 0,1 mg/l Biotin, 44 mM NaHCO_3 , sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

3.1.9 Puffer für reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Aqua dd _{DEPC}	doppelt deionisiertes H_2O mit 0,2% (v/v) Diethylpyrocarbonat für 4 Stunden gerührt, autoklaviert
Aqua dd _{PCR}	doppelt deionisiertes autoklaviertes H_2O für PCR (Fa. Roth)
Puffer VIIIA (2,5 x)	125 mM Tris (pH 8,3), 187,5 mM KCl, 7,5 mM MgCl_2 , 25 mM DTT, 1,25 mM dNTPs; -20°C
Puffer VIIIB (5 x)	25 mM Tris (pH 8,3), 100 mM KCl, 6,5 mM MgCl_2 , 1,25 mM dNTPs, 0,5% Triton X 100, 0,1% BSA; -20°C
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, in Aqua dd gelöst, pH 7,6
10 x PCR-Puffer	Fa. NaTuTec
Orange G (0,25%)	2,5 ml Orange G 1%, 3,0 ml Glycerin, 4,5 ml H_2O
DNS-Auftragepuffer für Agarosegele	0,1% (w/v) Orange G, 5% (w/v) Ficoll 400 in 5 x TAE-Puffer, 4°C
DNS-Größenmarker	40 µg DNS (1 Kb 100 Bp DNS-Größenmarker, Fa. Invitrogen), 250,0 µl DNS-Auftragepuffer, 1,0 ml TE-Puffer, 4°C

TAE-Gelelektrophorese-Puffer (50 x)	2 M Tris, 0,25 M Na-Acetat, 0,05 M EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O, mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt, autoklaviert
Nukleotidmix	25 mM dATP, 25 mM dTTP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, gelagert in 50 µl Aliquots bei -20°C

3.1.10 Lösungen für DNS-Klonierung

LB-Medium (Luria Bertani)	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8 g/l NaCl, in Aqua dd gelöst, pH 7,5 (mit NaOH), autoklaviert, 4°C
LB-Medium mit Ampicillin	500 ml LB-Medium, 100µg/ml Ampicillin
LB-Agarplatten	LB-Medium, 2% (w/v) Agar, 100 µg/ml Ampicillin
SOC-Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
X-Gal-Lösung	40 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid), gelöst in DMF (Dimethylformamid)

3.1.11 Lösungen für Sequenzgele

Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% Ammoniumperoxidsulfat; -20°C
TBE-Puffer „Long run“ (10x)	60,05 g Tris, 30,91 g Borsäure, 7,44 g EDTA-Na ₂ , ad 1 l, pH 8,0, autoklaviert
Polyacrylamidlösung 4%	30 ml Sequagel XR (6%), 7,5 ml Sequagel Puffer, 400 µl DMSO, 300 µl APS (10%)
Polyacrylamidlösung 6%	25,6 ml Sequagel XR (6%), 6,4 ml Sequagel Puffer, 6,4 g Urea, 1,6 ml TBE (10x), 12,0 ml Aqua dd, 16 µl TEMED, 320 µl APS (10%)
Sequagel Puffer	Fa. National Diagnostics
Sequagel XR	Fa. National Diagnostics

3.1.12 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und PAGE-Färbung

4 x Proteinauftragepuffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 6 M Harnstoff, 0,004% (w/v) Bromphenolblau, 0,004% (w/v) Phenolrot, 40% (v/v) Glycerin, filtriert, in 4 ml-Aliquots bei -20°C gelagert für reduzierende Bedingungen: Zugabe von 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol oder 10mM DTT
10% Jagow-Minigel Trenngel	2,5 ml Acrylamid, 3,3 ml Jagow-Gelpuffer, 3,6 ml Aqua dd, 0,5 ml Glycerin 87%, 50 µl APS 10%, 5 µl TEMED
4% Jagow-Minigel Stacking	1 ml Acrylamid, 2,5 ml Jagow-Gelpuffer, 6,4 ml Aqua dd, 80 µl APS 10%, 10 µl TEMED
10 x Anodenpuffer (Jagow)	2 M Tris-HCl, pH 8,9
10 x Kathodenpuffer (Jagow)	1 M Tris-HCl, 1 M Tricin, 1% SDS, pH 8,25
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Protein-Größenmarker)	Fa. Invitrogen
Coomassie Färbelösung	2,5 g Serva Blau, 454 ml Methanol, 92 ml Eisessig, auf 900 ml auffüllen, 100 g TCA hinzugeben
Entfärbelösung für Coomassie	10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol in Aqua dd
1 M NaCl in PBS ⁺⁺	58,44 g NaCl, auf 1 l auffüllen
SemiDry-Blotpuffer (Bjerrum)	3,028 g Tris, 14,41 g Glycin, 200 ml Methanol, auf 1 l auffüllen, pH 8,3 (pH-Wert nicht einstellen!)
Western Lightning® Chemiluminescence Reagent Plus (Enhanced Luminol Reagent, Oxidizing Reagent)	Fa. Perkin Elmer

3.1.13 Lösungen und Puffer für VLP-Reinigung

TEN-Puffer	0,05 M Tris, 0,001 M EDTA, 0,15 M NaCl, Aqua dd ad 1.000 ml, pH 7,4, autoklaviert
Saccharose 66% (w/w)	171,0 g Saccharose (D(+)-Saccharose, 342,3 g/mol), 90 ml Aqua _{dd}
1 M Tris-HCl	12,11 g Tris, Aqua dd _{DEPC} ad 100 ml, pH 8,0
2,698 M CsCl	454,2 mg CsCl/ml Aqua dd

3.1.14 Verbrauchsmaterialien

Einkanalpipetten 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1.000 µl	Fa. Biohit, Fa. Gilson
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturschalen, -platten	Fa. Falcon
Handschuhe (Rotiprotect® Latex und Nitril)	Fa. Roth
Kryoröhrchen	Fa. Nalgene
Protean Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher und Schüll, Bioscience GmbH, Whatmann® Group
Pipettenspitzen	Fa. Biozym
Pipettenspitzen aerosolresistent, nukleasefrei	Fa. Nerbe
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf, Fa. Falcon BD
Röntgenfilme BioMaxMR	Fa. Kodak
Spritzenfilter, aufschraubbar, 0,45 µm	Fa. Fisher Scientific
Trägernetze Elektronenmikroskopie (400 mesh Kupfer-Rodiumnetze)	Fa. Plano
Zellkulturflaschen	Fa. Falcon

3.1.15 Geräte

Analysenwaage	Fa. Sartorius
Bakterienschüttler	Fa. Heraeus
Brutschrank (mit CO ₂ -Begasung) Stericult 200	Fa. Forma Scientific
Brutschrank (ohne CO ₂ -Begasung)	Fa. WTC Binder
Digital Graphic Printer UP-D860E	Fa. Sony
DNA-Sequenzier Modell 4000L	Fa. Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA
Röntgenfilm-Entwicklermaschine Optimax	Fa. Protec
Gefriergeräte	Fa. Liebherr, Fa. Bosch
Gelkammern	Werkstatt Mehrzweckinstitut
Gel Print 2000L Dokumentationssystem	Fa. MWG-Biotech
Heizblock	Werkstatt Mehrzweckinstitut
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Kühlwasserbad RM6	Fa. Lauda
Kühlzentrifuge Kendro Megafuge 1,0R	Fa. Heraeus
Minishaker MS1 IKA	Fa. IKA-Labortechnik
PCR-Kabinett Holten Lamin Air/PCR Mini Typ HVPCR	Fa. Holten
PCR-Maschine GeneAmp PCR System 2400 (24 Proben)	Fa. Applied Biosystems/Perkin Elmer
PCR-Maschine Thermal Cycler 2720 (96 Proben)	Fa. Applied Biosystems
Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator	Fa. Biotech

Refraktometer 32423	Fa. Carl Zeiss
Reinstwasseranlage Purelab Plus UF	Fa. USF Deutschland GmbH
Rotoren für Ultrazentrifuge	Fa. Beckmann
Schüttler KS125 basic	Fa. IKA Labortechnik
Semi-Dry Transfer Cell	Fa. Biorad
Schütteltisch Rockomat Typ 270-2	Fa. Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Schütteltisch (horizontal) GFC-3006	Fa. GFC
Stromquellen Power Pac Basis 041BR	Fa. Biorad
Stromquellen Electrophoresis Power Supply EPS 600	Fa. Pharmacia
Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf
Ultrazentrifuge L8-70	Fa. Beckmann
UV-Leuchtplatte	Fa. Bachofer
Wasserbad WB10	Fa. Memmert GmbH & Co. KG
Zelleinfrierapparat „Mr. Frosty“	Fa. Nalgene
Zentrifuge (4°C) Kendro Megafuge 1,0 R	Fa. Heraeus
Zentrifuge (4°C) Biofuge Fresco	Fa. Heraeus
Zentrifuge (ohne Kühlung) Biofuge 13	Fa. Heraeus

3.1.16 Genbank-Zugangsnummern

3.1.16.1 Norovirus

Bezeichnung in phyl. Baum	Genbank-zugangs-nummer	Name	Referenz	Sequenz-bereich
Basel	AY042218	Human calicivirus NLV/Basel/2001/CH	(Goldenberger et al., 2001)	RdRp (part.)
BECCV186	AF542084	Bovine enteric calicivirus strain CV186-OH	(Smiley et al., 2003)	RdRp (part.), VP1, VP2
BECCV95	AF542083	Bovine enteric calicivirus strain CV95-OH	(Smiley et al., 2003)	RdRp (part.) VP1, VP2
Benetusser	AJ487811	Human calicivirus NLV/Benetusser/453/2002/Sp	(Buesa et al., 2002)	RdRp (part.)
Berlin211	AF325787	Human calicivirus NLV/Berlin 211-1/1999/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Berlin363	AF312728	Human calicivirus NLV/Berlin 363/2000/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Berne	AY042217	Human calicivirus NLV/Berne/2001/CH	(Goldenberger et al., 2001)	RdRp (part.)
BOCV521	AY549161	Bovine enteric calicivirus strain Bo/CV521-OH/2002/US	(Han et al., 2004)	VP1
BOCV551	AY549165	Bovine enteric calicivirus strain Bo/CV551-OH/2002/US	(Han et al., 2004)	VP1
BoJena	AJ011099	Bovine enteric calicivirus (isolate Jena)	(Liu et al., 1999)	komplettes Genom
Chiba	AB042808	Chiba virus	(Someya et al., 2000)	komplettes Genom
DCS990821	AB089881	Hu/NLV/OCS990821/2000/JP	(Iritani et al., 2003)	RdRp (part.)
Desertshield	U04469	Desert Shield virus DSV395	(Lew et al., 2000)	RdRp (part.), VP1

Bezeichnung in phyl. Baum	Genbank- zugangs- nummer	Name	Referenz	Sequenz- bereich
Dresden	AY741811	Norovirus Hu/NLV/ Dresden174/pUS- NorII/1997/GE	(Rohayem et al., 2006)	komplettes Genom
Erfurt007	AF312518	Human calicivirus NLV/Erfurt 007/2000/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Erfurt232	AF312725	Human calicivirus NLV/Erfurt 232/2000/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Erlangen155	AF312723	Human calicivirus NLV/Erlangen 155/2000/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Fortlauderdale	AF414426	Norwalk-like virus NLV/Fort Lauderdale/560/1998/US	(Fankhauser et al.)	RdRp (part.), VP1, VP2
FrankfurtO168	AF325781	Human calicivirus NLV/ Frankfurt (Oder) 168/1999/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Gelsenkirchen 468	AF312525	Human calicivirus NLV/ Gelsenkirchen 468/2000/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Gothenburg	AF365989	Human calicivirus NLV/ Gothenburg1/2001/ Sweden	(Nenonen et al.)	RdRp (part.)
Halle455	AF312513	Human calicivirus NLV/Halle 445/1999/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Hawaii	U07611	Hawaii calicivirus	(Lew et al., 1994)	komplettes Genom
Kiskunhalas	AF472571	Human calicivirus NLV/ Kiskunhalas/HUNo2/1999/ HUN	(Reuter et al., 2002)	RdRp (part.)
Koblenz229	AF312522	Human calicivirus NLV/Koblenz 229/2000/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Lleida	AJ487802	Human calicivirus NLV/Lleida/327/2001/Sp	(Buesa et al., 2002)	RdRp (part.)
Lordsdale	X86557	Lordsdale virus	(Dingle et al., 1995)	komplettes Genom
Magdeburg62	AF325775	Human calicivirus NLV/Magdeburg 62/1999/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Magdeburg548	AF312516	Human calicivirus NLV/ Magdeburg 548/1999/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Meliana	AJ487804	Human calicivirus NLV/Meliana/230/2001/Sp	(Buesa et al., 2002)	RdRp (part.)
MNV1	AY228235	Murine norovirus 1	(Karst et al., 2003)	komplettes Genom
MontBlanc287	AJ487791	Human calicivirus NLV/Montblanc/287/ 2001/Sp	(Buesa et al., 2002)	RdRp (part.)
Neustrelitz	AY772730	Norovirus Hu/NLV/GII/ Neustrelitz260/2000/DE	(Petznick et al.)	komplettes Genom
Newbury2	AF097917	Bovine enteric calici-like virus Newbury agent-2	(Dastjerdi et al., 1999)	komplettes Genom

Bezeichnung in phyl. Baum	Genbank-zugangs-nummer	Name	Referenz	Sequenz-bereich
Norwalk	AF093797	Norwalk virus	(Schreier et al., 2000)	komplettes Genom
Oberschleissheim149	AF325780	Human calicivirus NLV/Oberschleissheim 149/1999/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
OCS990821	AB089881	Hu/NLV/OCS990821/2000/JP	(Iritani et al., 2003)	RdRp (part.)
Oxford	AY587987	Norovirus Hu/NLV/Oxford/B4S7/2002/UK	(Dingle, 2004)	komplettes Genom
Pfaffenhofen 028	AF312519	Human calicivirus NLV/Pfaffenhofen 028/2000/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
QW101US	AY823304	Norovirus swine/GII/OH-QW101/03/US	(Wang et al., 2005a)	RdRp (part.), VP1, VP2
QW125US	AY823305	Norovirus swine/GII/OH-QW125/03/US	(Wang et al., 2005a)	RdRp (part.), VP1, VP2
QW170US	AY823306	Norovirus swine/GII/OH-QW170/03/US	(Wang et al., 2005a)	RdRp (part.), VP1, VP2
QW218US	AY823307	Norovirus swine/GII/OH-QW218/03/US	(Wang et al., 2005a)	RdRp (part.), VP1, VP2
QW48US	AY823303	Norovirus swine/GII/MI-QW48/02/US	(Wang et al., 2005a)	RdRp (part.), VP1, VP2
Rostock039	AF312520	Human calicivirus NLV/Rostock 039/2000/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Sagunt	AJ487808	Human calicivirus NLV/Sagunt/222/2001/Sp	(Buesa et al., 2002)	RdRp (part.)
SaintCloud	AF414427	Norwalk-like virus NLV/Saint Cloud/624/1998/US	(Fankhauser et al.)	RdRp (part.), VP1, VP2
Saitama	AB039776	Norwalk-like virus isolate: Saitama U3	(Katayama et al., 2002)	komplettes Genom
Snowmountain	AY134748	Snow Mountain virus	(Lochridge und Hardy, 2003)	komplettes Genom
SW43JP	AB074892	Sw/NLV/Sw43/1997/JP	(Sugieda et al., 1998)	RdRp (part.), VP1
SW918JP	AB074893	Sw/NLV/Sw918/1997/JP	(Sugieda et al., 1998)	RdRp (part.), VP1
Southampton	L07418	Southampton virus	(Lambden et al., 1993)	komplettes Genom
StFeliu	AJ487806	Human calicivirus NLV/St.Feliu/255/2001/Sp	(Buesa et al., 2002)	RdRp (part.)
SWE1157	AY247419	Human calicivirus NLV/1157-01/SWE	(Nilsson et al.)	RdRp (part.)
SWE1581	AY247422	Human calicivirus NLV/1581-00/SWE	(Nilsson et al.)	RdRp (part.)
Schwerin218	AF325789	Human calicivirus NLV/Schwerin 218/1999/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)
Tiefwareensee	AF312510	Human calicivirus NLV/Tiefwareensee 305/1999/DE	(Künkel et al.)	RdRp (part.)

Bezeichnung in phyl. Baum	Genbank-zugangs-nummer	Name	Referenz	Sequenz-bereich
Valencia	AJ487798	Human calicivirus NLV/Valencia/256/2001/Sp	(Buesa et al., 2002)	RdRp (part.)
Valencia426	AJ487810	Human calicivirus NLV/Valencia/426/2002/Sp	(Buesa et al., 2002)	RdRp (part.)
Veszprem	AF472570	Human calicivirus NLV/Veszprem/HU No11a/2000/HUN	(Reuter et al., 2002)	RdRp (part.)
Vietnam	AF504671	Norwalk virus strain Vietnam 026	(Hansman et al., 2004a)	komplettes Genom

Tab. 5: Genbankzugangsnummern von Vertretern des Genus *Norovirus*.

part.=partielle Sequenz, RdRp=RNS-abhängige RNS-Polymerase, VP1=Kapsidprotein, VP2=basisches Strukturprotein.

3.1.16.2 Sapovirus

Bezeichnung in phyl. Baum	Genbank-zugangs-nummer	Name	Referenz	Sequenz-bereich
Arg39	AF405715	Human calicivirus SLV isolate Arg39	(Martinez et al., 2002)	RdRp (part.)
Arg39	AY289803	Human calicivirus SLV/Arg39	(Farkas et al., 2004)	VP1, VP2
Arg54	AF405716	Human calicivirus SLV isolate Arg54	(Martinez et al., 2002)	RdRp (part.)
Bristol	AJ249939	Human calicivirus SLV/Bristol/98/UK	(Robinson et al., 2002)	komplettes Genom
C12	AY603425	Sapovirus C12	(Katayama et al., 2004)	komplettes Genom
Chatelrault	DQ 195157	Sapovirus Hu/ChatelraultE707/2004/France	(Bon et al.)	RdRp (part.)
Chiba010658	AJ412827	Sapporo virus(Hu/SLV/Chiba/010658F/2001)	(Okada et al., 2002)	Polyprotein (part.)
Cruiseship 2000	AY289804	Human calicivirus SLV/Cruise ship/2000/USA	(Farkas et al., 2004)	VP1, VP2
Dresden	AY694184	SapovirusHu/Dresden/pJG-Sap01/DE	(Gebhardt et al.)	komplettes Genom
Gorosgal	AF488718	Human calicivirus SLV/Gorosgal/HUNs12/2000/HUN	(Reuter et al.)	RdRp (part.)
Houston7-1181	AF435811	Human calicivirus SLV/Hou7-1181	(Farkas et al., 2004)	RdRp (part.)
Houston7-1181	AF435814	Human calicivirus SLV/Hou7-1181	(Farkas et al., 2004)	Polyprotein (part.)
HoustonDCC	U95643	Sapporo virus-Houston/86	(Jiang et al., 1997)	RdRp (part.)
Houston27	HCU 67859	Houston/27/90/US	(Berke et al., 1997)	RdRp (part.)
London29845	U95645	Sapporo virus-London/29845	(Jiang et al., 1997)	Polyprotein (part.), VP2

K8JP	AB222999	Porcine enteric Sapovirus strain: K8/JP	(Yin et al., 2006)	RdRp (part.)
K10JP	AB221131	Porcine enteric Sapovirus strain: K10/JP	(Yin et al., 2006)	Polyprotein (part.), VP2
K11JP	AB223000	Porcine enteric Sapovirus strain: K11/JP	(Yin et al., 2006)	RdRp (part.)
K13JP	AB223001	Porcine enteric Sapovirus strain: K13/JP	(Yin et al., 2006)	RdRp (part.)
Lyon	AJ251991	Human calicivirus strain Hu/SLV/Lyon/30388/98/F	(Schuffenecker et al., 2001)	Polyprotein (part.)
Lyon598	AJ271056	Human calicivirus Hu/SLV/Lyon/598/97/F	(Schuffenecker et al., 2001)	RdRp (part.), VP1, VP2
Manchester	X86560	Sapporo virus-Manchester	(Liu et al., 1995)	komplettes Genom
MC10	AY237420	Sapovirus Mc10	(Oka et al., 2005)	komplettes Genom
MEC	AF338407	Mink calicivirus strain MCV/20/1980/US	(Guo et al., 2001a)	RdRp (part.)
MECCanada	AY144337	Mink enteric calicivirus strain Canada 151A	keine Angabe (direkte Submission)	Polyprotein (part.), VP1
Mexiko240	AY157867	Human calicivirus SLV/Mex240/1990/Mex	(Farkas et al., 2004)	RdRp (part.)
Mexiko340	AF435812	Human calicivirus SLV/Mex340/1990/Mex	(Farkas et al., 2004)	VP1 (part.)
Mexiko14917	AF435813	Human calicivirus SLV/Mex14917/2000/Mex	(Farkas et al., 2004)	VP1, VP2
Moskau2240	AY538725	Sapovirus Hu/Moscow/2240/2002/RF	(Podkolzin et al.)	VP1, VP2
OHJJ259	AY826423	Sapovirus swine/OH-JJ259/00/US	(Wang et al., 2005b)	Polyprotein (part.), VP2
OHLL26	AY974195	Sapovirus Po/OH-LL26/2002/US	(Wang et al., 2005b)	Polyprotein (part.)
OHMM280	AY823308	Sapovirus swine/OH-MM280/03/US	(Wang et al., 2005b)	Polyprotein (part.), VP2
OHJJ681	AY974192	Sapovirus Po/OH-JJ681/2000/US	(Wang et al., 2005b)	Polyprotein (part.), VP2
Parkville	U73124	Sapporo virus-Parkville	(Noel et al., 1997b)	Polyprotein (part.), VP2
PECCowden	AF182760	Porcine enteric calicivirus Cowden	(Guo et al., 1999)	komplettes Genom
PECLL14	AY425671	Porcine enteric calicivirus strain LL14	(Chang et al., 2004)	komplettes Genom
PECNL	AY615811	Porcine enteric calicivirus isolate SWECII/VA103	(van der Heide et al.)	RdRp (part.)
Plymouth	X86559	Human enteric calicivirus (Plymouth isolate)	(Liu et al., 1995)	Polyprotein (part.), VP2
Potsdam	F294739	Human calicivirus strain HuCV/Potsdam/2000/DEU	(Kuenkel und Schreier)	Polyprotein (part.)
Potsdam	AF294739	Human calicivirus strain HuCV/Potsdam/2000/DEU	(Kuenkel und Schreier)	Polyprotein (part.)
PretoriaMK17	U50825	HuCV/Pretoria/MK17/94/S A	(Wolfaardt et al.)	RdRp (part.)

QW19US	AY826424	Sapovirus swine/MI-QW19/02/US	(Wang et al., 2005b)	RdRp (part.)
QW270	AY826426	Sapovirus swine/NC-QW270/03/US	(Wang et al., 2005b)	Polyprotein (part.), VP2
Sapporo	U65427	Sapporo virus-Sapporo	(Numata et al., 1997)	RdRp, VP1, VP2
Stockholm	AF194182	Human calicivirus strain Hu/SLV/Stockholm/318/97/SE	(Vinje et al., 2000a)	VP1 (part.)
SWE3	AY615814	Porcine enteric calicivirus isolate SWECIII/VA112	(van der Heide et al.)	RdRp (part.)
Vanderbijlpark	U43287	Human calicivirus HuCV/Vanderbijlpark/3136/16/93/SA	(Wolfaardt et al.)	RdRp (part.)

Tab. 6: Genbankzugangsnummern von Vertretern des Genus *Sapovirus*.

part.=partielle Sequenz, RdRp=RNS-abhängige RNS-Polymerase, VP1=Kapsidprotein, VP2=basisches Strukturprotein.

3.1.16.3 Weitere Caliciviren

Bezeichnung in phyl. Baum	Genbank-zugangs-nummer	Name	Referenz	Sequenz-bereich
CaninesCV	NC_004542	Canine calicivirus	(Matsuura und Tohya, 2002)	komplettes Genom
Cetacean	U52091	Cetacean calicivirus	(Matson et al., 1996)	RdRp (part.)
EBHSV	NC_002615	European brown hare syndrome virus	(Le Gall et al., 1996)	komplettes Genom
FCV1	NC_001481	Feline calicivirus	(Sosnovtsev und Green, 1995)	komplettes Genom
FCV2024	AF479590	Feline calicivirus strain FCV2024	(Thumfahrt und Meyers, 2002)	komplettes Genom
Nebraska	AY082891	Calicivirus strain NB	(Smiley et al., 2002)	komplettes Genom
Newbury1	DQ013304	Newbury agent 1	(Oliver et al., 2006a)	komplettes Genom
RHDV-FRG	NC_001543	Rabbit hemorrhagic disease virus-FRG	(Meyers et al., 2000)	komplettes Genom
SMSV-S1	U15301	San Miguel sea lion virus	(Neill et al., 1995)	komplettes Genom
VESV-Pan-1	AF091736	VESV-like calicivirus strain Pan-1	(Rinehart-Kim et al., 1999)	komplettes Genom

Tab. 7: Genbankzugangsnummern von Vertretern der Genera *Vesivirus*, *Lagovirus* und des nicht klassifizierten Genus innerhalb der Familie Caliciviridae.

part.=partielle Sequenz, RdRp=RNS-abhängige RNS-Polymerase.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (Klasse II) durchgeführt.

3.2.1.1 Insektenzellen (SF-21)

Bei der Zelllinie SF-21 handelt es sich um eine Insektenzelllinie, die aus dem Ovar von *Spodoptera frugiperda*, des Eulenfalters, stammt. Diese Zellen benötigen zum Wachstum eine Temperatur von $28^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$. Eine bei Säugerzellen übliche CO_2 -Begasung ist nicht notwendig. Die Vermehrung erfolgte je nach Bedarf in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm^2 (T25), 75 cm^2 (T75) bzw. 175 cm^2 (T175), die 5 ml (T25), 10 ml (T75) bzw. 25 ml (T175) Insektenzellmedium benötigten.

Die Passagierung der Zellen erfolgte zweimal wöchentlich. Bei einem 4-Tage-Rhythmus betrug der Umsetzfaktor 1:4, bei einem 3-Tage-Rhythmus 1:3. Dazu wurde der Überstand abgenommen, dem Zellrasen eine geringe Menge Medium (T25: 1,5 (1:3) bzw. 2 ml (1:4), T75/T175: 3 ml (1:3) bzw. 4 ml (1:4)) zugegeben und die Zellen durch Abklopfen resuspendiert. Die dem Umsetzfaktor entsprechende Menge Zellsuspension wurde in mit Medium gefüllte Zellkulturflaschen überführt.

3.2.1.2 Säugerzellen

Bei den Säugerzelllinien MDBK, SFT-R und BEL-26 handelt es sich um adhärenz Zellen, die bei 37°C , 5% CO_2 und wasserdampfgesättigter Atmosphäre optimales Wachstum zeigen. Die Säugerzellen wurden in CCM-34 mit 10% FKS in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm (MDBK, SFT-R) bzw. 15 cm (BEL-26) gehalten. Das Umsetzen der Zellen erfolgte 2 x (MDBK, SFT-R) bzw. 1 x wöchentlich (BEL-26). Hierzu wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit Trypsinlösung gewaschen und mit 1 ml Trypsinlösung für etwa 5 Min. im Brutschrank inkubiert. Die nachfolgend vereinzelter Zellen wurden in geeigneten Verdünnungen umgesetzt (MDBK: 1:12-1:20, SFT-R: 1:3, BEL-26: 1:4).

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtanzahl lebender Zellen wurde der Überstand adhärenz Zellen abgenommen und die Zellen wie oben beschrieben abgelöst. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Trypanblau-Exklusionstestes, bei dem tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und dadurch blau angefärbt werden. 20 μl Zellsuspension wurden mit 180 μl Trypanblau-Lösung vermischt (1:10) und die lebenden Zellen ohne sichtbare Blaufärbung in

vier Großquadraten einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Diagonale) unter einem Invertmikroskop ausgezählt.

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$n \times 4 \times V \times 1.000/3,2 = \text{Zellzahl/ml},$$

(n = Anzahl in vier Großquadraten, V = Verdünnungsfaktor).

3.2.1.4 Infektion von bovinen, ovinen und SF21-Zellen

MDBK-, SFT-R und BEL-26-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät. Der Überstand eines subkonfluenten Zellrasens wurde abgenommen, die Zellen mit Kulturmedium ohne FKS gewaschen und drei Vertiefungen je Ansatz mit je 100 µl, 20 µl bzw. 4 µl Organsuspension (siehe Kapitel 3.2.2.2) für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C in CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen mit je 1 ml Kulturmedium (5% FKS (v/v)) aufgefüllt und drei bis vier Tage (MDBK/SFT-R) bzw. sechs bis sieben Tage (BEL-26) inkubiert und täglich unter einem Invertmikroskop betrachtet. Der Überstand der Vertiefungen, die einen zytopathischen Effekt aufwiesen, wurde nachfolgend elektronenmikroskopisch oder in einer PCR weiter untersucht.

Die Infektion mit aufgearbeitetem Darmmaterial erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik. Zusätzlich wurde eine Infektion mit sterilfiltriertem Überstand von in der Norovirus RT-PCR positiven Kotproben durchgeführt.

Die Infektion von SF21-Zellen erfolgte mit einer MOI (Multiplicity of Infection) zwischen 1 und 10. Dazu wurden die Zellen resuspendiert, mit Hilfe des Trypanblauexklusionstestes ausgezählt und als subkonfluenter Zellrasen ausgesät ($1,8\text{-}2 \times 10^6$ Zellen/ml). Je nach gewünschter Menge wurden T25 oder T75 Zellkulturflaschen zur Infektion genutzt. Damit die Zellen sich an den Boden der Zellkulturflasche heften konnten, wurden die Flaschen mit der gewünschten Zellzahl eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die gewünschte Menge Baculovirus-Suspension zugegeben und ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch (zwei Seitwärtsbewegungen pro Minute) inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen bis zur üblichen Menge Überstand aufgefüllt (T25: 5 ml, T75: 10 ml) und in einem Zellkulturinkubator bei 28°C ohne CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Dauer der Inkubation war abhängig davon, ob der Überstand zur Virus- oder Proteingewinnung verwendet werden sollte. Um einen möglichst hohen Titer zu erzielen, wurden die Zellkulturflaschen zur Virusproduktion bis zur vollkommenen Lyse der Zellen inkubiert (ca. eine Woche). Um rekombinantes Protein zu erhalten, wurden die Flaschen bis zu Beginn eines zytopathischen Effektes inkubiert (zwei bis drei Tage). Anschließend wurden die Zellen im Überstand resuspendiert, dieser abgenommen und die Zellen bei 2.500 U/Min. für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde abgenommen und zur weiteren

Verwendung bei 4°C gelagert. Bei der Proteingewinnung wurde vor dem Resuspendieren der Zellen Proteinase-Inhibitor-Cocktail zugegeben (1 µl pro ml Überstand).

3.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurden die Zellen in einer 25 cm²-Zellkulturflasche (T25) bzw. einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser in Überstand resuspendiert (Säugerzellen vorher trypsinisiert), die Zellen vom Überstand durch Zentrifugation getrennt, in 1 ml Einfriermedium (MDBK/SFT-R: je nach Zelldichte 2-3 ml (ca. 1×10^7 Zellen/ml)) aufgenommen und je 1 ml in ein spezielles Einfrierröhrchen gegeben. Die Zellen wurden in einem Einfrierapparat („Mr. Frosty“, Nalgene) langsam (ca. 1°C/Min.) auf -70°C heruntergekühlt und anschließend über flüssigem Stickstoff gelagert.

Eingefrorene Zellen wurden unter fließendem Wasser schnell aufgetaut, in Kulturmedium aufgenommen und in Kulturgefäße ausgesät (SF-21: T25, Säugerzellen: 10 cm-Schale).

3.2.2 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

3.2.2.1 Aufarbeitung von Kotproben für die RNS-Präparation

Zu untersuchende Kotproben wurden zunächst 1:10 in PBS def. verdünnt (1 g auf 10 ml), auf einem Schüttler bei Raumtemperatur für 15 Min. durchmischt und bei 4.000 U (2.772 x g) 10 Min. in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. 140 µl des Überstandes wurden unmittelbar zur RNS-Extraktion eingesetzt, der verbleibende Überstand wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.2 Aufarbeitung von Organproben für die RNS-Präparation

Etwa 1 g Darmmaterial wurde in einem sterilen Mörser kleingeschnitten, mit einer Spatelspitze sterilem Seesand aufgerieben und anschließend 10 ml Medium (CCM-34) dazu pipettiert. Das Homogenisat wurde in ein 12 ml-Röhrchen überführt und für 10 Min. bei 4000 U (2.772 x g) in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde in ein 6 ml-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert.

140 µl des Überstandes wurden unmittelbar zur RNS-Präparation eingesetzt, der verbleibende Überstand bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.3 RNS-Präparation

Für die RNS-Präparation wurde das QIAamp Viral RNA[®] Mini Kit (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Silicamembranen. 140 µl des zuvor gewonnenen Überstandes wurden in 560 µl AVL-Puffer für 10 Min. bei Raumtemperatur lysiert, um RNasen zu inaktivieren und die Isolierung intakter RNS zu gewährleisten. Die dem AVL-Puffer zugefügte Carrier-RNS verbessert die Bindung der viralen Nukleinsäuren an die QIAamp Membran, was besonders bei Proben mit einer geringen Menge RNS von Vorteil ist. Anschließend wurden 560 µl

Ethanol (p.A.) zugegeben, mit einer Pipette durchmischt und 630 µl davon auf eine Präparationssäule (QIAamp Mini Spin Column) gegeben. Nach Zentrifugation bei 6.000 x g für 1 Min. bei 4°C wurde der Durchfluß verworfen, die Säule in ein frisches Sammelgefäß überführt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurden 500 µl Puffer AW1 auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (6.000 x g/1 Min./4°C). Der Durchfluß wurde erneut verworfen und die Säule in ein frisches Sammelgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW2 erfolgte eine Zentrifugation der Säule für 3 Min. bei 20.000 x g. Die Puffer AW1 und AW2 waschen Kontaminanten (Proteine, Nukleasen u.a.) von der Membran. Im letzten Schritt wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und die RNS mit Hilfe von 40 µl AVE-Puffer eluiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Min. bei Raumtemperatur wurde die Säule ein letztes Mal bei 6.000 x g für 1 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Eluat wurde sofort in der RT-PCR eingesetzt und anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.2.4 DNS-Extraktion

In Fällen, in denen DNS untersucht wurde (z.B. positive Plaques der Baculovirus-Transfektion) wurde die Nukleinsäureextraktion mit dem QIAamp DNA® Mini Kit (Fa. Qiagen), dessen Prinzip ebenfalls auf der Bindung von Nukleinsäuren an Silicamembranen basiert, nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 200 µl der Probe wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Lysispuffer AL zugesetzt, kräftig durchmischt und für 10 Min. bei 56°C in einem Schüttelheizblock inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol (p.A.) zugesetzt und der Ansatz nach kräftigem Mischen auf eine QIAamp Spin Säule überführt. Nach Zentrifugation bei 6.000 x g für 1 Min. bei Raumtemperatur wurde der Durchfluß verworfen, die Säule auf ein frisches Sammelgefäß überführt und 500 µl Waschpuffer AW1 auf die Matrix pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde der Waschpuffer AW2 zugegeben und eine Zentrifugation für 3 Min. bei 20.000 x g durchgeführt. Die Säule wurde abschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, 50 µl AE-Puffer zugegeben, nach einer Inkubationszeit von 1 Min. bei Raumtemperatur für 1 Min. bei 6.000 x g zentrifugiert und damit die in der Membran gebundene DNS eluiert. Das Eluat wurde vor und nach Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2.5 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNS mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in DNS umgeschrieben. Dazu wurden je 9 µl Startmix, der den reversen Primer sowie Aqua dd_{PCR} enthält, auf 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt, die aufgearbeitete Nukleinsäure dazu pipettiert (siehe Standard RT-PCR-Protokoll, Kapitel 3.2.2.8.1) und diese in einem Thermocycler auf 94°C erhitzt (RNS-Denaturierung). Nach Abkühlung auf 4°C wurde der RT-Mix zugegeben, der neben dem Puffer VIIa die Enzyme RNase Inhibitor und reverse Transkriptase enthält. Die reverse Transkription wurde bei 42°C für 30 Min. durchgeführt. Anschließend wurde die

reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 94°C inaktiviert und damit die reverse Transkription gestoppt. Abschließend erfolgte eine Abkühlung der Reaktion auf 4°C.

3.2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine in vitro-Methode, mit der man gezielt DNS-Segmente in sich mehrfach wiederholenden Zyklen vervielfältigen kann. Nach Auftrennung der doppelsträngigen DNS durch Erhitzen (Denaturierung) können sich ausgewählte Oligonukleotidprimer über spezifische Basenpaarung an die Einzelstränge anlagern (Annealing) und von einer Polymerase verlängert werden (Elongation), so dass neue Stränge entstehen, die zum Ausgangsstrang komplementär sind. Dies führt zur exponentiellen Vermehrung der Ziel-Nukleinsäure in den nachfolgenden Zyklen der PCR.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Standard-PCR-Protokoll des diagnostischen Labors des Instituts für Virologie, FB 10 der JLU Giessen für die Untersuchungen verwendet (siehe RT-PCR-Protokolle 3.2.2.8.1). Der nach der reversen Transkription hergestellten cDNS wurde dabei 30 µl des PCR-Mixes zugegeben.

Im Falle einer Untersuchung von DNS-Proben wurden 47,5 µl PCR-Mix, die sowohl den kodierenden als auch den reversen Primer enthielten, in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 2,5 µl DNS hinzugefügt (siehe Standard DNS-PCR-Protokoll, Kapitel 3.2.2.8.3).

3.2.2.7 Auswahl der Primer

Die Auswahl der Primer erfolgte zum Teil aus der Literatur. Weitere Primer wurden mit Hilfe des Programmes PrimerExpress® der Firma ABI und anhand von Vergleichen von in der Genbank enthaltenen Sequenzdaten ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die Primer wurden als Lyophilisate von den Firmen Operon bzw. MWG (Sequenzierprimer) bezogen, mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 50 µM eingestellt und in Aliquots á 50 µl bei -20°C aufbewahrt. Die folgende Tab. 8 gibt eine Übersicht über die zur Detektion verwendeten Primer, deren Sequenz sowie die Region und Größe des Detektionsbereiches:

Primer	Sequenz (5' - 3')	Genus	Region/Größe PCR-Produkt/Referenz
JV12Y (F)	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA	Norovirus	RdRp 327 Bp (Vennema et al., 2002)
JV13I (R)	TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG		
NoV-Bac-01F	ATG AAG ATG ACT GAC AGA GAY A	Norovirus	VP1 959 Bp eigenes Design
NoV-Bac-02R	GAA AAA TCT GGA AAG CCA A		
SR80(+) (F)	TGG GAT TCT ACA CAA AAC CC	Sapovirus	RdRp 320 Bp (Vinje et al., 2000a)
JV33 (R)	GTG TAN ATG CAT TCA TCA CC		

Primer	Sequenz (5' - 3')	Genus	Region/Größe PCR-Produkt/ Referenz
PEC-03F	GTG TTC GTG ATG GAG GC	Sapovirus	VP1 385 Bp eigenes Design
PEC-02R	AGC GCA CAC AGC AAT T		

Tab. 8: Primer zur Detektion von Noro- und Sapoviren.
F: kodierender Primer, R: reverser Primer.

3.2.2.8 RT-PCR-Protokolle

3.2.2.8.1 RT-PCR

Für die RT-PCR wurde das folgende Standard-Protokoll des diagnostischen Labors verwendet:

Mix	Menge (pro Ansatz)	Reagenz	Amplifikationsbedingungen
Start-Mix	0,2 µl <u>8,8 µl</u> 9,0 µl + 2 µl Probe	reverser Primer (50 µM) Aqua dd _{PCR}	RNS-Denaturierung 94°C - 3 Min. abkühlen auf 4°C - 2 Min.
RT-Mix	8,0 µl 0,25 µl <u>0,25 µl</u> 8,5 µl	Puffer VIIIA RNase Inhibitor Reverse Transkriptase	RT(cDNS-Synthese) 42°C - 30 Min. Enzymdenaturierung 94°C - 2 Min. abkühlen auf 4°C - 2 Min.
PCR-Mix	0,2 µl 10,0 µl 19,6 µl <u>0,2 µl</u> 30,0 µl	kodierender Primer (50µM) Puffer VIIIB Aqua dd _{PCR} Taq-Polymerase	Denaturierung 94°C - 3Min. PCR (30 - 40 Zyklen): Denaturierung 94°C - 30 Sek. Annealing 37 - 60°C - 30 Sek. Elongation 74°C - 30 Sek. - 3 Min. abschließende Elongation 74°C - 5 - 15 Min.

Tab. 9: Standard-Protokoll für RT-PCR.

Die Annealingtemperaturen wurden abhängig von der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Elongationszeiten wurden abhängig von der Größe des zu generierenden PCR-Produktes gewählt (mindestens 30 Sek., 1 Min. pro 1.000 Basenpaare).

3.2.2.8.1.1 Norovirus RT-PCR (Teil des Polymerasegens)

Diese RT-PCR erlaubt die Detektion von Noroviren aller Genera. Die Primer sind stark degeneriert und benötigen daher die extrem niedrige Annealingtemperatur von 37°C. Mit Hilfe dieser RT-PCR wurden alle Kotproben in dieser Arbeit auf das Vorhandensein von

Norovirus-RNS untersucht. Die Primer JV13I und JV12Y wurden der Literatur entnommen (Vennema et al., 2002) und basieren auf den von Vinje entwickelten Primern JV12 und JV13 (Vinje und Koopmans, 1996). Tab. 9 zeigt das Standard-Protokoll der RT-PCR-Bedingungen sowie die Reaktionsansätze.

3.2.2.8.1.2 Norovirus RT-PCR (Teil des Kapsidgens)

Diese RT-PCR ist speziell auf bovine Noroviren zugeschnitten. Sie erlaubt keine Detektion porciner oder humaner Noroviren. Die Primer NoV-Bac-01F (kodierender Primer) und NoV-Bac-02R (reverser Primer) wurden durch Sequenzvergleiche boviner Noroviren mit Hilfe des Programmes PrimerExpress® (Fa. ABI) entwickelt (Daten nicht gezeigt). Die Annealingtemperatur wurde auf 45°C festgelegt. 30 Zyklen wurden durchgeführt. Mit dieser RT-PCR wurden nur Proben untersucht, die bereits in der in Kapitel 3.2.2.8.1.1 beschriebenen RT-PCR positiv waren.

3.2.2.8.1.3 Sapovirus RT-PCR (Teil des Polymerasegens)

Das Primerpaar dieser PCR (SR80(+)) (kodierender Primer) und JV33 (reverser Primer)) stammt ebenfalls aus der Literatur (Vinje et al., 2000a). Der kodierende Primer SR80 wurde bereits zuvor beschrieben (Noel et al., 1997b). Auch hier liegt die Annealingtemperatur mit 37°C sehr niedrig. Mit Hilfe dieser PCR kann man alle Genogruppen des Genus *Sapovirus* detektieren. Mit dieser PCR wurden alle Kotproben von Schweinen, kleinen Wiederkäuern, anderen Spezies sowie einige Proben von Rindern untersucht.

3.2.2.8.1.4 Sapovirus RT-PCR (Teil des Kapsidgens)

Diese RT-PCR ist speziell auf porcine enterale Sapoviren der Genogruppe III zugeschnitten. Sie erlaubt keine Detektion humaner Sapoviren und porciner enteraler Sapoviren der Genogruppe VI. Die Primer PEC-03F (kodierender Primer) und PEC-02R (reverser Primer) wurden durch Sequenzvergleiche porciner Sapoviren mit Hilfe des Programmes PrimerExpress entwickelt. Mit dieser RT-PCR wurden alle Kotproben von Schweinen untersucht. Die Annealingtemperatur wurde auf 45°C festgelegt und 30 Zyklen durchgeführt.

3.2.2.8.2 „One Step“ RT-PCR

Das „One Step“ RT-PCR Kit® (Fa. Qiagen) wurde verwendet, um den Polymerase-Kapsid-Übergang der Sapovirusisolate von Schweinen zu amplifizieren. Bei dem „One Step“-Verfahren werden reverse Transkription und PCR ohne weitere Pipettierschritte in einem Röhrchen durchgeführt. Der im Kit enthaltene Enzymmix beinhaltet eine optimierte Kombination von Omniscript und Sensiscript reverser Transkriptase und DNS Polymerase, wodurch die Effizienz der Reaktion erhöht wird. Die spezielle Zusammensetzung an KCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erlaubt ein Annealing der Primer über eine größere Temperaturspanne, wodurch die Primer SR80(+) und PEC-02R auch bei 50°C eingesetzt werden können. Nach Ansetzen

des Mastermixes wurde dieser in die Reaktionsgefäße verteilt und je 2,5 µl RNS hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden nachfolgend erst bei Erreichen von 50°C in die PCR-Maschine eingesetzt und analog dem in Tab. 10 beschriebenen Protokoll inkubiert.

Menge (pro Ansatz)	Reagenz	Amplifikationsbedingungen
0,6 µl	kodierender Primer (50 µM)	RT (cDNS-Synthese)
0,6 µl	reverser Primer (50 µM)	50°C - 30 Min.
10,0 µl	5x QIAGEN One Step RT-PCR Puffer	reverse Transkriptase-Denaturierung/Polymerase-Aktivierung
2,0 µl	dNTP-Mix	95°C - 15 Min.
2,0 µl	QIAGEN One Step RT-PCR Enzymmix	
0,25 µl	RNase Inhibitor	
<u>32,05 µl</u>	Aqua dd _{PCR}	PCR (40 Zyklen):
47,5 µl		Denaturierung 94°C - 1 Min.
+ 2 µl Probe		Annealing 50°C - 1 Min.
		Elongation 72°C - 1,30 Min.
		abschließende Elongation
		72°C - 10 Min.

Tab. 10: Protokoll der „One Step“ RT-PCR® (Fa. Qiagen).

Dieses Protokoll wurde zur Amplifikation des Polymerase-Kapsid-Überganges der Sapovirusisolate von Schweinen angewendet.

3.2.2.8.3 DNS-PCR (Standard-Protokoll)

Die folgende Tabelle zeigt das Standard-Protokoll der verwendeten DNS-PCR:

Mix	Menge (pro Ansatz)	Reagenz	Amplifikationsbedingungen
PCR-Mix	0,5 µl	kodierender Primer (50 µM)	Denaturierung 94°C - 3 Min.
	0,5 µl	reverser Primer (50 µM)	
	5,0 µl	PCR-Puffer (10x)	PCR (30 Zyklen):
	40,9 µl	Aqua dd _{PCR}	Denaturierung 94°C - 30 Sek.
	0,4 µl	dNTP-Mix	Annealing 45 - 60°C - 30 Sek.
	<u>0,2 µl</u>	Taq-Polymerase	Elongation 74°C - 30 Sek. - 3 Min.
	47,5 µl		
	+ 2 µl Probe		abschließende Elongation
			74°C - 5 – 15 Min.

Tab. 11: Standardprotokoll für DNS-PCR.

Die Annealingtemperaturen wurden abhängig von der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Elongationszeiten wurden abhängig von der Größe des zu generierenden PCR-Produktes gewählt (mindestens 30 Sek., 1 Min. pro 1.000 Basenpaare).

3.2.2.9 Analyse der PCR-Produkte

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden zunächst horizontale Agarosegele vorbereitet. Die Konzentration dieser Gele hing dabei von der Fragmentgröße ab. Für Fragmente bis zu einer Größe von 150 Bp wurden 2%-ige (w/v) Gele, für Fragmente von 150-1.000 Bp 1,5%-ige Agarosegele und für Fragmente über 1.000 Bp 1%-ige Agarosegele gegossen. Die Agarose wurde in 1%-igem TAE-Puffer gelöst, aufgeköcht und bei 60°C in flüssigem Zustand in einem Wasserbad aufbewahrt.

Nach dem Abkühlen des Gels wurde dieses in eine Gelelektrophoresekammer überführt und mit 1%-igem TAE-Puffer überschichtet. Dieser Puffer wurde frisch mit bidestilliertem Wasser aus einer 50%-igen Stocklösung hergestellt. Dem 1%-igen TAE-Puffer wurden 100 µg/l Ethidiumbromid zugefügt, welches zwischen den Strängen der DNS interkaliert und diese damit unter UV-Licht sichtbar macht.

Jeweils 2 µl Auftragepuffer wurden mit 8 µl der PCR-Produkte vermischt und 8 µl dieses Gemisches in eine Vertiefung des Agarosegels aufgetragen. Zur Auswertung wurde pro Gel mindestens in eine Vertiefung 8 µl des 1 Kb (Fragmente über 1.000 Bp Größe) bzw. des 100 Bp (Fragmente unter 1.000 Bp) Größenmarkers aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer elektrischen Gleichspannung von 9 V/cm für 35 Min.. Die Fluoreszenz wurde unter UV-Durchlicht einer Wellenlänge von 254 nm betrachtet und zur Dokumentation der Ergebnisse durch Thermodruck fotografiert.

Die PCR bzw. RT-PCR wurde als valide betrachtet, wenn die Positivkontrolle eine Bande in der zu erwartenden Größe aufwies und alle Negativ- und Kontaminationskontrollen frei von Banden waren.

3.2.2.10 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Auftrennung der amplifizierten DNS wurden 1%-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Nach Agarosegelelektrophorese wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht auf dem Transilluminator (320 nm) lokalisiert, zügig mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt.

Die Reinigung der DNS aus Agarose erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction® Kits (Fa. Qiagen) nach den Vorgaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silicamembran, während Kontaminanten die Membran passieren. Die DNS wird hierbei von Salzen, Enzymen u.a. getrennt. Zunächst wurde das 3-fache Gelvolumen an Puffer QG zu den Agarosefragmenten zugegeben (je 100 µg Agarosegel 300 µl Puffer QG) und für 10 Min. bei 50°C in einem Schüttelinkubator gelöst. Dieser Puffer solubilisiert das Gelfragment und besitzt zudem einen pH-Indikator, da die Adsorption von DNS an die Membran nur bei einem pH-Wert von $\leq 7,5$ stattfinden kann. Sollte der pH-Wert zu hoch liegen, schlägt die Farbe des Puffers von gelb nach orange-violett um und kann mit Hilfe von 3 M Natriumacetat korrigiert

werden. Nach Auflösung der Gelfragmente wurde der Probe ein Gelvolumen Isopropanol zugesetzt, um die Bindung an die Matrix von DNS-Fragmenten, die kleiner als 500 Bp bzw. größer als 4 Kb waren, zu erhöhen. Auf Fragmente mit einer Größe zwischen 500 Bp und 4 Kb hatte dieser Schritt keinen Einfluß. Nach kräftigem Mischen wurde der Überstand auf eine QIAquick Spin[®] Säule überführt und 1 Min. bei 10.000 x g/ 4°C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Auch die im nachfolgenden beschriebenen Zentrifugationsschritte wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt. Die Säule wurde anschließend in ein neues Sammelgefäß überführt und 750 µl Puffer PE auf die Membran pipettiert. Der Ethanol-haltige Puffer PE wäscht Salze quantitativ aus. In einem weiteren Schritt wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt und der restliche Puffer PE, der mit nachfolgenden enzymatischen Reaktionen interagieren könnte, durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt entfernt. Nachfolgend wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, 30 µl Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) auf die Matrix pipettiert und die gebundene DNS nach einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur von 1 Min. durch Zentrifugation eluiert.

Zur Kontrolle der Elution wurden im Anschluss 4 µl eluierte DNS mit 5 µl Auftragepuffer vermischt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Konzentration des Agarosegeles hing dabei von der Größe des Fragmentes ab (siehe Analyse der PCR-Produkte, Kapitel 3.2.2.9). Die Betrachtung erfolgte unter UV-Durchlicht einer Wellenlänge von 254 nm. Die Ergebnisse wurden zur Dokumentation fotografiert.

Die eluierte DNS wurde entweder sofort zur Klonierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.2.3 Klonierung von DNS-Fragmenten

3.2.3.1 Ligation

Zur Klonierung wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit (Fa. Invitrogen) verwendet. Das Prinzip des TA-Clonings beruht darauf, dass die bei der PCR eingesetzte Taq-Polymerase eine nicht-Template abhängige terminale Transferase-Aktivität besitzt. Hierdurch werden einzelne Adenosinreste an das 3'-Ende von PCR-Produkten angehängt. Eine Verlängerung der abschließenden Elongation bei der PCR auf 10 Min. erhöht die Ausbeute terminaler Adenosin-Reste. Der linearisierte Vektor des Kits (pCR 2.1-TOPO[®]) besitzt einen 3'-Thymidin-Überhang. Dadurch kann das PCR-Fragment effizient in den Vektor ligiert werden. Das Enzym Topoisomerase I, aus Vaccinia Virus isoliert, bindet sequenzspezifisch an doppelsträngige DNS und spaltet die Phosphodiesterbrücke nach dem Motiv 5'-CCCTT in einem DNS-Strang. Die resultierende Energie wird zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Stranges und dem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase verwendet. Diese Phospho-Tyrosyl-Bindung zwischen DNS und Enzym kann

nachfolgend durch das 5'-Hydroxyl eines DNS-Stranges angegriffen werden; diese Reaktion kann zur Ligation von DNS ohne Einsatz von Ligase verwendet werden (Shuman, 1994).

Abhängig von der Bandenstärke der eluierten DNS wurden 0,5-4,0 µl DNS zur Klonierung eingesetzt. Der Ansatz wurde nach Bedarf mit sterilem Wasser auf 4,0 µl aufgefüllt. Die zugefügte Salzlösung (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) erhöht die Anzahl der Transformanten um das zwei- bis dreifache. Auch kann dadurch die Inkubationszeit der Ligation verlängert werden, da das Enzym Topoisomerase I daran gehindert wird, sich erneut an die DNS zu binden und bereits ligierte PCR-Amplifikate freizusetzen. Die genaue Zusammensetzung der Reaktion ist in der folgenden Tab. 12 zusammengestellt:

Reagenz	Menge
frisches PCR-Produkt (Eluat nach Gelextraktion)	0,5 – 4,0 µl
Salzlösung	1,0 µl
steriles Wasser	addieren auf ein Volumen von 5,0 µl
TOPO [®] -Vektor	1,0 µl
Endvolumen	6,0 µl

Tab. 12: Mix für Ligation mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Fa. Invitrogen).

Nach vorsichtigem Mischen der Reagenzien wurde die Reaktion für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3.2 Transformation

Unmittelbar nach der Ligation wurden 2 µl dieser Reaktion vorsichtig in ein Gefäß mit „One shot[®] chemically competent E. coli“ (TOP 10[®]) (Fa. Invitrogen) gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 Sek. bei 42°C wurden die Ansätze erneut auf Eis gestellt, 250 µl SOC Medium dazugegeben und die Bakterien eine weitere Stunde bei 37°C in einen Schüttelinkubator gestellt. In der Zwischenzeit wurden pro Transformation zwei Agarplatten mit LB-Medium plus Ampicillin (100 µg/ml) vorgewärmt und jeder Platte 40 µl X-Gal (40 mg/ml) zugesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde pro Ansatz auf eine Platte 40 µl, auf eine zweite Platte 100 µl des Transformationsgemisches ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Der verwendete Vektor pCR 2.1 TOPO[®] besitzt zum einen eine Ampicillinresistenz, zum anderen das lac-Z'-Gen. Lac-Z' kodiert für das N-terminale α-Fragment der β-Galactosidase. Wird dieses durch Insertion eines DNS-Fragmentes zerstört, bleiben Kolonien nach Inkubation mit X-Gal weiß. Dadurch können positive Klone durch blau-weiß-Selektion erkannt werden, da Klone, in die kein Fragment insertiert wurde, das α-Fragment der β-Galactosidase exprimieren und sich blau färben (Mülhardt, 2002).

3.2.3.3 Minipräparation von Plasmid-DNS

Von jedem Ansatz wurden sieben Galaktosidase-negative (weiße) Bakterienkolonien gepickt und in 3 ml LB-Medium in einem Schüttler bei 200 rpm und 37°C über Nacht vermehrt. Die Selektion plasmidhaltiger Kolonien erfolgte durch Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml Medium). 2 ml der Kulturen wurden am nächsten Tag in ein 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für 10 Min. bei 5000 U bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge pelletiert.

Die Minipräparation wurde mit Hilfe des QIAprep® Miniprep Kits (Fa. Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen, gefolgt von einer Absorption der DNS an eine Silikamembran im Beisein hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Bei der hier angewandten Methode der modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) wurden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert, das Lysat anschließend neutralisiert und mit Salz zur Bindung versetzt.

Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 (enthält RNase A) durch Pipettieren resuspendiert und anschließend in 250 µl Puffer P2 (NaOH/SDS) im Beisein von RNase A lysiert (Birnboim, 1983). SDS solubilisiert die Phospholipid- und Protein-Komponenten der Zellmembran, was zur Lyse und zum Freiwerden des Zellinhaltes führt, während die alkalischen Bedingungen die chromosomale und die Plasmid-DNS sowie Proteine denaturiert. Das Lysat wurde durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 neutralisiert und an die hohen Salzkonzentrationen adaptiert, die zu einer Denaturierung von Proteinen und zur Präzipitation von Zellbestandteilen und SDS führen, wohingegen die kleinere Plasmid-DNS korrekt renaturiert und in Lösung bleibt.

Die Ansätze wurden anschließend 10 Min. wie auch in den folgenden Zentrifugationsschritten bei 17.900 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden auf QIAprep spin® Säulen (Fa. Qiagen) überführt und 1 Min. zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säulen in neue Sammelgefäße überführt und mit 750 µl Puffer PE, der Salze effizient entfernt, gewaschen und wiederum 1 Min. zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, 50 µl Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) auf die Matrix pipettiert und nach 1 Min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur 1 Min. eluiert. Plasmid-DNS wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3.4 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurde zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation durchgeführt, wobei 0,1-0,2 µg Plasmid-DNS je Verdau eingesetzt wurde.

Die verwendeten Restriktionsenzyme und deren Puffer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Reagenzien (pro Ansatz)	Menge	Verwendung: Vektor pCR 2.1 TOPO® und Fragmente folgender Primerpaare
EcoRV	0,2 µl	NoV (JV12Y/JV13I)
BamHI	0,2 µl	NoV (NoV-Bac-01F/02R)
Puffer K	1,0 µl	SaV (JV33/SR80)
BSA	1,0 µl	SaV (PEC-02F/03R)
Aqua dd	<u>5,6 µl</u>	
	8,0 µl	
	+ 2,0 µl Plasmid	

Tab. 13: Zusammensetzung der Ansätze für einen Restriktionsverdau.

Die Restriktionsenzyme wurden hier für den Vektor pCR 2.1 TOPO® mit folgenden PCR-Fragmenten gewählt: NoV (JV12Y/JV13I), NoV (NoV-Bac-01F/02R), SaV (JV33/SR80) sowie SaV (PEC-02F/03R). Der Puffer K führt zu optimalen Bedingungen mit den Restriktionsenzymen EcoRV und BamHI.

Je 8,0 µl des Enzymmixes wurden mit 2 µl Plasmid-DNS vermischt und für 1 Stunde bei 37°C in einem Heizblock verdaut. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 4,0 µl Auftragepuffer dazugegeben, das Gemisch auf ein horizontales Agarosegel aufgetragen und nach einer Laufzeit von 35 Min. bei 9 V/cm unter UV-Licht betrachtet.

Dabei waren im positiven Fall mindestens zwei Banden sichtbar: eine in der Größe des Vektors und eine in der des klonierten Fragmentes.

3.2.4 DNS-Sequenzierung

3.2.4.1 Sequenz-PCR

Die DNS-Sequenzierung wurde mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt, bei der die zu sequenzierende DNS denaturiert, mit einem Primer hybridisiert und dieser mit einer DNS-Polymerase verlängert wird. Den sonst identischen Ansätzen (alle vier dNTPs, DNS-Polymerase, Primer, DNS aus Minipräparation, ddH₂O) wird je eine der vier Basen zum Teil als ddNTP zugegeben, welche keine 3'-Hydroxylgruppe besitzt. Daher ist, sobald diese in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird, eine DNS-Verlängerung durch die DNS-Polymerase nicht mehr möglich. Nach diesem Prinzip entstehen DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in den einzelnen Reaktionsansätzen mit dem jeweils zugegebenen ddNTP enden. Anschließend werden diese in einem denaturierenden Acrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt. Da die verwendeten Primer M13IR (kodierend) und M13IRrev (revers) am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (IRD 800) markiert sind, können sie durch Anregung über einen Laser und Detektion des emittierten Lichtes sichtbar gemacht werden. Die Sequenzen werden nachfolgend computergestützt ausgelesen. Für jedes untersuchte Isolat wurden jeweils drei unabhängige Klone sequenziert, die zuvor durch Kontrollrestriktion getestet worden waren.

Prämix 1 kodierend	Prämix 2 revers	Amplifikations- bedingungen
2,0 µl Primer M13IR (1 pMol/µl) 14,0 - 23,0 µl Minipräp auf 25,0 µl auffüllen mit Aqua dd	2,0 µl Primer M13IRrev (1 pMol/µl) 14,0 - 23,0 µl Minipräp auf 25,0 µl auffüllen mit Aqua dd	Denaturierung 94°C - 2 Min.
davon je 6,0 µl in: Mix ddGTP 2,0 µl Mix ddATP 2,0 µl Mix ddTTP 2,0 µl Mix ddCTP 2,0 µl		30 Zyklen: Denaturierung 94°C - 15 Sek. Annealing 56°C - 15 Sek. Elongation 70°C - 30 Sek.
je 4,0 µl Fluoreszenzladepuffer in jede Reaktion pipettieren		abkühlen: 14°C - 10 Min.
		70°C - 2 Min. abkühlen auf 4°C

Tab. 14: Protokoll der Sequenz-PCR mit den Primern M13IR und M13IRrev.

3.2.4.2 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Die Auftrennung der Kettenabbruchfragmente erfolgte in 0,25 mm dicken denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen. Dabei wurden Gele einer Länge von 66 cm für das Lesen von bis zu 1.200 Basen, Gele einer Länge von 40 cm für bis zu 800 Basen verwendet.

Nach dem Reinigen der Glasplatten mit 1%-igem SDS und Ethanol wurden diese zusammengesetzt und die Polyacrylamidlösung vorbereitet (66 cm lange Gele: Konzentration von 4%, 40 cm lange Gele: 6%). Die Gellösung wurde zügig mit einer Spritze durch einen aufgeschraubten 0,45 µm-Filter blasenfrei zwischen die Scheiben appliziert und ein Spacer eingesetzt, um einen Probenschlitz zu erzeugen. Nach einer Polymerisationszeit von etwa einer Stunde wurden die Scheiben und der Probenschlitz gereinigt und das Gel zu einem 30-minütigen Vorlauf (1.500 V, 37 mA, 50 W, 50°C bei kurzen 40 cm-Gelen; 45 Min., 2.000 V, 37 mA, 50 W, 45°C bei langen 66 cm-Gelen) zwischen die Elektroden des automatischen Sequenzierautomaten (LICOR 4000 L[®], Fa. LICOR) eingesetzt. Als Elektrophoresepuffer diente 1%-iger TBE-„Long Run“-Puffer, der frisch aus 10%-iger Stocklösung hergestellt wurde.

Nach dem Vorlauf wurden Luftblasen im Probenschlitz entfernt, ein 48er-Haifischzahnkamm eingesteckt, je 1,2 µl der Proben in jede Vertiefung pipettiert und die Hochspannung unter den gleichen Bedingungen wieder angeschaltet. Nach einer Justierung von Laser und Scanner (Programm „Data Collection“) wurde der Scanner eingeschaltet. Das Programm „Data Collection“ zeichnete das durch Laserlichtanregung im IR-Bereich erzeugte Bild auf.

Die Sequenzierung erfolgte über Tag (40 cm-Gele) bzw. über Nacht (66 cm-Gele). Die Laufzeit betrug ca. 100 Basen pro Stunde.

3.2.4.3 Auswertung der Sequenzdaten

Die mit dem Programm „Data Collection“ aufgezeichneten Daten wurden mit Hilfe des Programmes „Image Analysis“ analysiert und manuell nachkontrolliert. Die entsprechenden DNS-Sequenzen wurden nach Bearbeitung über eine FTP-Verbindung zur weiteren Analyse auf einen Server des DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) in Heidelberg geleitet und dort mit dem HUSAR-Programmpaket (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) weiter bearbeitet.

Sequenzen, die nicht als Calicivirus-Sequenzen identifiziert wurden, wurden mit dem Basic Local Alignment Search Tool (Blast) weiter bearbeitet. Mit BLAST wird eine Sequenz mit anderen aus der Genbank verglichen und ähnliche Sequenzen dargestellt (Altschul et al., 1990; McGinnis und Madden, 2004).

3.2.5 Phylogenetische Analysen

Die phylogenetischen Analysen wurden mit Hilfe des Programmpaketes PHYLIP (phylogeny inference package) durchgeführt. Dies ist ein umfangreiches Programmpaket für phylogenetische Analysen und wurde von Felsenstein an der Universität von Washington entwickelt (Felsenstein, 1993).

Die zu analysierenden Sequenzen wurden zunächst mit bekannten Sequenzen aus der Genbank verglichen und mit dem Befehl „Pileup“ aneinander ausgerichtet. Ein solches sogenanntes Alignment der Sequenzen ist Voraussetzung für eine weitere Analyse mit dem PHYLIP-Programm.

Die in diesen Alignments zusammengestellten Sequenzen wurden mit der Kimura-2-Parameter-Methode paarweise miteinander verglichen und so der Grad der genetischen Distanz berechnet (Kimura, 1980). Aus der resultierenden Distanzmatrix wurde mit Hilfe der „Neighbor-joining“-Methode (Saitou und Nei, 1987) ein phylogenetischer Baum erstellt. Zur statistischen Absicherung der erhaltenen Gruppierungen wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1.000 Replikaten durchgeführt (Felsenstein, 1985, 1988; Hedges, 1992; Efron et al., 1996).

3.2.6 Elektronenmikroskopie

3.2.6.1 Vorbereitung von Kot- und Organproben für die Elektronenmikroskopie

Zu untersuchende Kot- und Organproben wurden analog zu der Nukleinsäure-Extraktion vorbereitet (siehe Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2). 30 µl des Überstandes wurden auf ein Stückchen Parafilm gegeben und darauf vorsichtig ein mit einem dünnen Kunststofffilm beschichtetes und mit Kohlenstoff bedampftes Probennetzchen (Durchmesser 3,05 mm)

gelegt. Die Bedampfung mit Kohlenstoffatomen verbessert die mechanische Festigkeit des Kunststofffilmes bzw. den Widerstand gegen den Elektronenstrahl, macht andererseits die Netzen jedoch hydrophob, weswegen die Netze zusätzlich beglimmt werden müssen, um eine Benetzung des Filmes mit Probenmaterial zu ermöglichen. Dieses Netzen wurde nach einigen Minuten wieder abgenommen, überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt und das Netzen anschließend etwa eine Minute auf 30 µl Kontrastmittel (2% Methylaminowolframat) gelegt. Danach wurde erneut überschüssige Flüssigkeit abgesaugt.

3.2.6.2 Untersuchung von Probennetzen im Elektronenmikroskop

Die präparierten Netzen wurden anschließend im Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss 910) betrachtet. Dabei wurde zunächst der Zustand der Netzen sowie die Kontrastierung beurteilt und im Zweifel eine neue Präparation durchgeführt; beispielsweise wurde bei einem zu dichten Präparat eine Verdünnung mit PBS durchgeführt. Durch Methylaminowolframat wird eine sogenannte Negativkontrastierung erzeugt, das heißt, dass das Kontrastmittel aufgrund der Oberflächenspannung um die Partikel herum einen elektronendichten Saum bildet. Die Partikel selbst werden dadurch nicht gefärbt, sondern erscheinen hell mit einem dunklen Rand. Für das Auffinden von Partikeln ist eine hohe Zahl (10^6 - 10^7 /ml) notwendig, so dass die elektronenmikroskopische Untersuchung eine geringe Sensitivität besitzt. Ein negatives Ergebnis schließt daher das Vorliegen einer Virusinfektion nicht sicher aus.

3.2.6.3 Immunelektronenmikroskopie

Für die Immunelektronenmikroskopie wird der Probenpräparation ein Schritt vorgeschaltet. Bei der Festphasen-Immunelektronenmikroskopie wird das Probennetzen zunächst auf einem Tropfen Antikörperlösung vorinkubiert, worauf aufgrund der Bindung von Viruspartikeln an auf dem Trägernetz befindliche Antikörper und dadurch resultierender Aggregatbildung eine bessere Nachweismöglichkeit besteht. Bei der Flüssigphasen-Immunelektronenmikroskopie werden Probe und Antikörper zunächst vermischt und das Probennetzen darauf verbracht. Hier erfolgt eine Bindung der Antikörper an in der Probe befindliche Partikel bereits vor der Bindung an das Probennetzen. Dies führt zur Vernetzung der Viruspartikel und dadurch zur Aggregatbildung. Diese Aggregate können leichter detektiert werden.

Fest- und Flüssigphasen-Immunelektronenmikroskopie wurden mit Hilfe eines gegen bakteriell exprimiertes humanes Sapovirus-Kapsid hergestellten Kaninchenserums sowie eines Human-Serums gegen humane Noroviren durchgeführt.

3.2.6.4 Präparation von Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie

SF-21 Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren, die das Kapsidprotein VP1 des porzinen enteralen Sapovirus (Stamm PEC Cowden) exprimieren, infiziert. 45 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert, pelletiert, mit 1% Osmiumtetroxid erneut fixiert, einer Blockkontrastierung mit Uranylacetat unterzogen, anschließend in einer Ethanolreihe dehydriert und bei 56°C in Epoxidharz eingebettet. Von den Blöcken wurden Ultradünnschnitte hergestellt, die mit Uranylacetat und Blei nach Reynolds kontrastiert wurden und elektronenmikroskopisch untersucht werden konnten.

3.2.7 Herstellung von rekombinanten virusähnlichen Partikeln (VLPs) mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems

3.2.7.1 Gewinnung von Sequenzdaten des gesamten VP1 und VP2

Zunächst mussten Sequenzdaten gewonnen werden. Dafür wurde cDNA von je zwei ausgewählten Isolaten (zwei bovine Noroviren, zwei porcine enterale Sapoviren) nach dem in Tab. 15 beschriebenen Protokoll mit einem oligoDT-21 Primer, der an den 3'-terminalen Poly-A-Schwanz bindet, hergestellt.

Mix	Menge (pro Ansatz)	Reagenz	Amplifikationsbedingungen
Start-Mix	1,0 µl <u>13,0 µl</u> 14,0 µl	Primer oligoDT21 Aqua dd _{PCR}	5 µl Ausgangsmaterial dazu pipettieren RNS-Denaturierung 94°C - 3 Min. abkühlen auf 4°C - 2 Min.
RT-Mix	40,0 µl 0,5 µl 0,5 µl <u>40,0 µl</u> 81,0 µl	Puffer VIIIA RNase Inhibitor Reverse Transkriptase Aqua dd _{PCR}	RT(cDNS-Synthese) 45°C - 30 Min. Enzymdenaturierung 94°C - 2 Min. abkühlen auf 4°C - 2 Min.

Tab. 15: Herstellung von cDNA mit einem oligoDT-21 Primer.

Anschließend wurden für die Amplifikation des VP1 und VP2 boviner Noroviren mehrere, sich überlappende Fragmente (647 bis 959 Basenpaare groß) mit den nachfolgend aufgelisteten Primern generiert. Diese Fragmente lieferten die komplette Sequenz des VP1 sowie des VP2 der zwei untersuchten Isolate.

Für das VP1 und VP2 der Sapoviren konnte mit den Primerpaaren PEC-01F und 06R direkt das komplette gewünschte Fragment amplifiziert werden. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Primer	Sequenz (5'-3')	Virus	Größe PCR-Produkt
NoV-Bac-01F	ATG AAG ATG ACT GAC AGA GAY A	bovines Norovirus	VP1 959 Bp
NoV-Bac-02R	GAA AAA TCT GGA AAG CCA A		
NoV-Bac-03F	GAT TTG GGY GCY TTT GT	bovines Norovirus	VP1 704 Bp
NoV-Bac-04R	CCA ACA CTA GCA TTT CCC		
NoV-Bac-05F	TGA ATT ATG TTA AYG GGA AYA	bovines Norovirus	VP1, VP2 647 Bp
NoV-Bac-06R	CGA TCT GTA TTA AAC CAW CC		
PEC-01F	ATG AGA GCC AGA AGT GTT C	porzines enterales Sapovirus	VP1 + VP2 2.149 Bp
PEC-06R	TCA CAC TTT GCT GTG AGT G		

Tab. 16: Primer zur Sequenzierung des VP1 und VP2 von bovines Noroviren sowie porzines enteralen Sapoviren.

3.2.7.2 Vektor pBlueBacHis2A (Fa. Invitrogen)

Der Baculovirus Transfervektor pBlueBacHis2A® (Fa. Invitrogen) wurde für die Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen konstruiert. Proteine, die mit Hilfe dieses Vektors exprimiert werden, haben am N-Terminus einen 6x-Histidin-Schwanz, der für den Nachweis einer erfolgreichen Expression hilfreich ist.

3.2.7.2.1 Herstellung der gewünschten Inserts

Als Ausgangsprodukte wurden je eine in der RT-PCR positive Kotprobe eines Rindes (bovines Norovirus) bzw. eines Schweines (porzines enterales Sapovirus) genommen, Nukleinsäure frisch aus dem Ausgangsmaterial aufgearbeitet und direkt in der PCR eingesetzt. Dazu wurde zunächst mit einem oligoDT-Primer cDNA hergestellt und aus dieser dann mit Hilfe von Primern (Tab. 17), die Schnittstellen entsprechend der Vektorsequenz enthalten, das gewünschte Fragment gewonnen (DNS-PCR Protokoll siehe Kapitel 3.2.2.8.3).

Bovines Norovirus (VP1 + VP2)	Porzines Enterales Sapovirus (VP1 + VP2)
18161-XhoI-H2f CTCGAGATGAAGATGACTGACAGAGATATTGC	M25-XhoI-His2f CTCGAGATGGAGGCGCCTG
18161-HindIII-H2r AAGCTTCAAAAACGTCTGCCAAGGTTT	M25-HindIII-His2r AAGCTTCACACTTTGCTGTGAGATG
Fragmentgröße: 2.200 Bp	Fragmentgröße: 2.146 Bp

Tab. 17: Primer mit Schnittstellen zur Klonierung in Baculovirus Transfervektor pBlueBacHis2A® (5'-3'). (Fa. Invitrogen). 5'-Schnittstelle: XhoI, 3'-Schnittstelle: HindIII. Schnittstellen sind umrahmt.

Die Fragmente wurden wie zuvor bereits beschrieben (Kapitel 3.2.2.10) aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt und zunächst in den Vektor pCR 2.1-TOPO® (Fa. Invitrogen) (Beschreibung siehe Kapitel 3.2.3) kloniert. Die erhaltenen Minipräparationen der Plasmid-

DNS wurden in den im nachfolgenden Kapitel 3.2.7.2.1.1 beschriebenen Restriktionsverdau eingesetzt und sind dort als „DNS“ bezeichnet.

3.2.7.2.1.1 Restriktionsverdau

Das in den Vektor pCR 2.1-TOPO® klonierte Fragment wurde durch Restriktionsverdau isoliert und in den Vektor pBlueBacHis2A® (Fa. Invitrogen) subkloniert. Für den Restriktionsverdau wurden folgende Reaktionsansätze hergestellt:

Reagenz	Vektor (pBlueBacHis2A)	Insert
DNS	1,0 µl (= 1,0 µg)	10,0 µl
Aqua _{dd}	15,0 µl	6,0 µl
Puffer M	2,0 µl	2,0 µl
XhoI	1,0 µl	1,0 µl
HindIII	1,0 µl	1,0 µl
Gesamt	20,0 µl	20,0 µl

Tab. 18: Ansatz für Restriktionsverdau zur Klonierung in den Vektor pBlueBacHis2A® (Fa. Invitrogen).

Die Ansätze wurden für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Nach 85 Min. wurde zum Vektor 1 µl alkalische Phosphatase (= 1 U/µl) zugegeben und 5 Min. bei 37°C weiter inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Auftragepuffer wurde das Gemisch komplett auf ein 1%-iges horizontales Agarosegel aufgetragen und nach einer Laufzeit von 35 Min. bei 9 Volt/cm die gewünschte Bande mit einer sauberen Skalpellklinge ausgeschnitten. Die Extraktion der Nukleinsäure erfolgte wie bereits in Kapitel 3.2.2.10 beschrieben mit Hilfe des QIAquick® Gelextraktionskits (Fa. Qiagen). Zur Kontrolle wurden 4 µl extrahierte DNA mit 5 µl Auftragepuffer vermischt, dieses Gemisch auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben aufgetrennt.

3.2.7.2.1.2 Ligation

Anhand der Bandenintensität wurde das Verhältnis Vektor zu Insert abgeschätzt, welches optimal bei 1:3 liegt. Folgende Ansätze wurden pipettiert:

Reagenz	Menge
Insert	5,0-15,0 µl (Verhältnis abschätzen)
Vektor	5,0 µl
Ligase-Puffer (10x)	1,0-2,5 µl (1/10 Gesamtvolumen)
T4-DNA-Ligase	1,0 µl

Tab. 19: Ligationsmix.

Als Negativkontrolle wurde an Stelle des Inserts Aqua_{dd} in der gleichen Menge verwendet. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C in einem Kühlwasserbad.

3.2.7.2.1.3 Transformation

Der gesamte Ligationsansatz wurde in je ein Röhrchen mit kompetenten Zellen (JM109) gegeben und eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 Sek. bei 42°C wurde die Reaktion erneut für 4 Min. auf Eis gestellt und anschließend 500 µl SOC-

Medium zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen bei 3500 U/5 Min./4°C zentrifugiert und der Überstand auf 100 µl reduziert. Das Zellpellet wurde in dem reduzierten Überstand resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.7.2.1.4 Minipräparation von Plasmid-DNS

Die entstandenen Kolonien wurden wie zuvor beschrieben weiter behandelt (Kapitel 3.2.3.3). Der DNS-Gehalt der Minipräparationen wurde durch UV-Lichtabsorption der 1:50 verdünnten Minipräparationen (2 µl in 98 µl Aqua dd_{PCR}) in einer Quarzglasküvette bei 260 nm in einem Photometer (Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Fa. Pharmacia Biotech) gemessen. Die Absorption wurde gegen Aqua dd_{PCR} als Referenz bestimmt und die Plasmidmenge in µg/µl mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Absorption} \times 50 \times 50 = \mu\text{g/ml} : 1.000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

3.2.7.3 Transfektion von Insektenzellen

Das Bac-N-Blue[®] Transfektionskit (Fa. Invitrogen) beinhaltet linearisierte DNS des Autographa californica multiple-embedded nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV). Diese wird zur Cotransfektion von SF21-Zellen mit dem das gewünschte Gen enthaltenden Baculovirus-Transfer-Vektor verwendet. Durch das Reagenz Cellfectin[®] wird bei der Transfektion ein positiv-geladener liposomaler DNS-Komplex gebildet, der an die negativ-geladene Plasmamembran bindet. Die Liposomen fusionieren mit der Zellmembran, und die DNS wird von der Zelle aufgenommen. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden 2×10^6 SF21-Zellen pro Ansatz auf einer Zellkulturschale ausgesät und 30 Min. anhaften gelassen. In der Zwischenzeit wurde folgender Transfektionsmix angesetzt:

Reagenz	Menge
rekombinantes Transfer-Plasmid	4 µg
SF900II-Medium (ohne Antibiotika)	1,0 ml
Cellfectin [®] (gut durchmischen, stets als letztes dazugeben)	20 µl

Tab. 20: Zusammensetzung Transfektionsmix.

Dieser Ansatz wurde 10 Sek. vorsichtig durchmischt und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der ausgesäten Zellen abgenommen und die Zellen zweimal mit je 2 ml SF900II-Medium ohne Antibiotika gewaschen. Anschließend wurde der gesamte Transfektionsmix tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, die Zellkulturschalen mit Parafilm verschlossen und die Reaktion vier Stunden auf einem Schütteltisch bei zwei Seitwärtsbewegungen pro Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 ml SF900II-Medium mit Antibiotika dazu pipettiert und die Schalen in einen 28°C-Brutschrank ohne CO₂-Zufuhr gestellt.

Nach 72 Stunden konnte der Überstand (Transfektions-Virusstock) entnommen, 3 ml frisches SF900II-Medium mit Antibiotika dazugegeben und weitere 48 Stunden inkubiert werden. Insgesamt 120 Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand wiederum abgenommen und aufbewahrt. Spätestens zu diesem Zeitpunkt konnten lichtmikroskopische Zellveränderungen (zytopathische Effekte) festgestellt werden. Anzeichen einer Infektion von Insektenzellen mit Baculoviren können in frühe (innerhalb der ersten 24 Stunden: vergrößerter Zelldurchmesser, Vergrößerung des Zellkerns), späte (24-72 Stunden: sistieren des Zellwachstums, granuläres Aussehen, Einschlusskörperchen, Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale) und sehr späte Anzeichen (> 72 Stunden: Zelllyse) eingeteilt werden.

Alle erhaltenen Baculovirus-Überstände wurden bei 4°C gelagert.

3.2.7.4 Plaque-Reinigung des Transfektions-Virusstocks

3.2.7.4.1 Plaque-Test

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Baculovirus-Transfektionsvektor pBlueBacHis2A[®] (Fa. Invitrogen) besitzt lacZ⁺ und Baculovirus-ORF1629-Sequenzen, die homolog zu denen der Bac-N-Blue-DNS[®] sind. Letztere liegt linearisiert vor, wodurch Sequenzen am C-Terminus des ORF1629, die essentiell für eine effiziente Vermehrung des Virus sind, zu entfernen. Wenn eine Rekombination zwischen pBlueBacHis2A[®] und der Bac-N-Blue-DNS[®] auftritt, werden diese essentiellen Sequenzen wiederhergestellt und vermehrungsfähiges, rekombinantes Virus wird gebildet. Als Folge dieser Rekombination entstehen blaue, einschlusskörperchenfreie rekombinante Plaques.

Um sicherzugehen, dass kein Wildtyp-Virus vermehrt wurde, wurden die erhaltenen Transfektions-Virusstocks Plaque-gereinigt. Dazu wurden 1,8 x 10⁶-Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte in je 1 ml Medium ausgesät, anheften gelassen und anschließend 600 µl Überstand pro well abgenommen (Negativkontrolle: 400 µl). Die Zellen wurden anschließend mit je 200 µl des Virusstocks in den Verdünnungen 10⁻¹ bis 10⁻⁵ für eine Stunde inokuliert. Danach wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mit Agarose-Medium-Lösung, die X-Gal enthielt, überschichtet. Die Platten wurden bis zur Bildung von Plaques (fünf bis zehn Tage) bei 28°C gelagert.

3.2.7.4.2 Vermehrung rekombinanter Plaques

Zur Vermehrung rekombinanter Plaques wurden 6-well-Platten mit 1,8 x 10⁶-Zellen/well vorbereitet. Blaue, einzeln liegende Plaques wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und je ein Plaque-enthaltendes Agarosestückchen in je einem well resuspendiert. Die Platten wurden bis zur Zelllyse inkubiert (etwa sieben Tage), die Zellen im Überstand resuspendiert, in ein Röhrchen gefüllt und 10 Min./4.000U/4°C zentrifugiert.

3.2.7.4.3 Analyse der vermehrten Plaques

Der Überstand wurde anschließend in einer DNS-PCR mit dem Primerpaar Baculo-forward und Baculo-reverse nach dem DNS-Standard-Protokoll (Kapitel 3.2.2.8.3) analysiert. Die Annealing-Temperatur lag bei 55°C.

Die Primer Baculo-forward und -reverse flankieren das Polyhedrin-Gen. Beim Vorhandensein von Wildtyp-Bac-N-Blue® DNS wird ein 839 Bp großes Fragment generiert. Der Vektor pBlueBacHis2A® generiert ein 338 Bp großes Fragment plus das in den Vektor insertierte Fragment (~ 2,2 Kb).

3.2.7.4.4 Zweite Plaquereinigung

Bei in der PCR positiven, den Wildtyp nicht enthaltenden Plaques wurde die Plaquereinigung wie oben beschrieben wiederholt. Blaue Plaques wurden erneut vermehrt und mit Hilfe der PCR analysiert.

Das gesamte Prozedere ist in Abb. 9 schematisch dargestellt.

3.2.7.5 Western Blot (Semi Dry-Verfahren)

Beim Immunoblot werden die in der Probe enthaltenen Proteine entsprechend ihrer Größe mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Nachfolgend werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran aus Nitrozellulose transferiert.

Möchte man in einer Probe Antigen nachweisen, kommen antivirale Antikörper zum Einsatz. Im Falle des Nachweises der Baculovirus-exprimierten Kapsidproteine ist dies ein gegen den aus sechs Histidinresten bestehenden Markerbereich gerichteter α -penta-His Antikörper. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem enzymmarkierten speziesspezifischen Antikörper, in diesem Fall einem Ziege α -Maus Peroxidase-Konjugat. Die Membran wird danach mit einem Substrat inkubiert, welches durch das am sekundären Antikörper befindliche Enzym zu einem Produkt umgesetzt werden kann. Diese Enzymreaktion wird durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht und auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

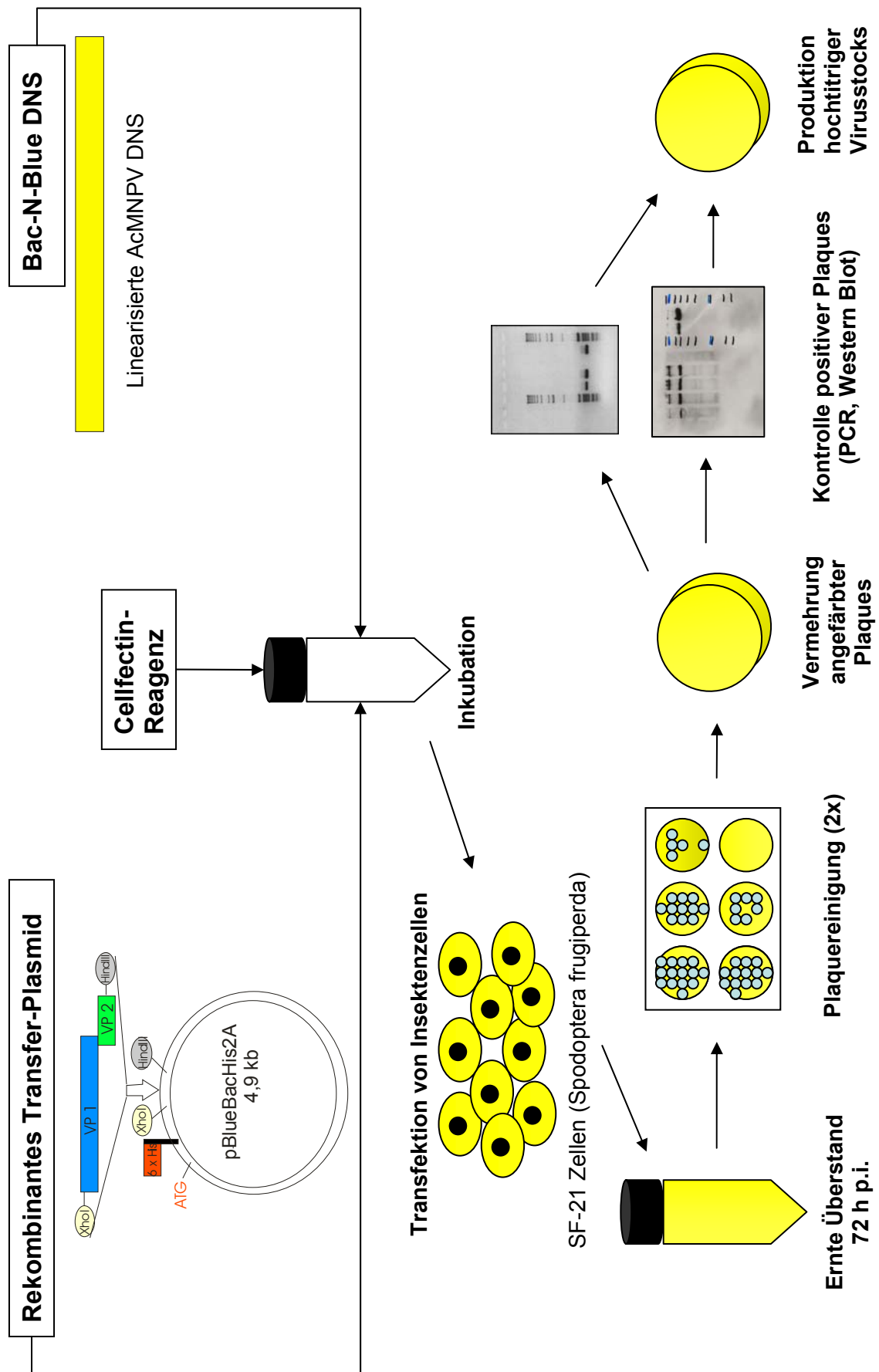


Abb. 9: Transfektion von Insektenzellen, Plaquereinigung und Produktion hochtitriger Virusstocks.

Nach Aufbau der Western Blot-Apparatur wurde zwischen zwei Scheiben ein horizontales Gel gegossen. Dazu wurde zunächst bis etwa 1,5 cm unter dem Rand ein 10%-iges Jagow-Minitrenngel gegossen und dieses mit Aqua_{dd} überschichtet. Nach einer Wartezeit von 20 Min. konnte das Wasser vorsichtig abgegossen und das Minitrenngel mit einem Stacking-Gel überschichtet werden, in das ein Kamm eingesetzt wurde.

In der Zwischenzeit wurden die Proben vorbereitet. 15 µl Zellkulturüberstand bzw. Zellextrakt wurden mit 5 µl Puffer (4 x Verdünnungspuffer mit Harnstoff ohne (nicht reduzierend) bzw. mit β-Mercaptoethanol (reduzierend)) vermischt und 3,5 Min. auf 95°C erhitzt.

Das Einsetzen der Gelplatten in die Apparatur erfolgte nach Polymerisation des Stacking-Gels. Der Zwischenraum zwischen zwei Gelen wurde mit Kathodenpuffer, der äußere Bereich mit Anodenpuffer gefüllt. Nach Beladen der Gele wurde eine Spannung von 100 V angelegt und für eineinhalb bis zwei Stunden beibehalten. Anschließend wurde das Gel vorsichtig auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, diese zusammen mit dem Gel etwa 20 Min. in Semi-Dry-Blotpuffer inkubiert und anschließend zwischen zwei Filterpapieren in eine Semi-Dry Transfer-Apparatur gegeben. Der Transfer erfolgte für 20 Min. bei 20 V. Die Membran wurde anschließend in ein Aluminiumkästchen gegeben und eine Stunde lang mit 5% Trockenmilch in PBS/Tween unter vorsichtigem Schwenken geblockt. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen für jeweils 15 Min. mit PBS⁺⁺. Der erste Antikörper (α-penta-His) wurde 1:2.000 in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert.

Am folgenden Tag erfolgten folgende Waschschrirte: 30 Min. mit PBS⁺⁺, 30 Min. mit 1 M NaCl in PBS und 30 Min. mit PBS/Tween. Der zweite Antikörper (Ziege α-Maus PO) wurde 1:10.000 verdünnt eingesetzt und die Membran damit 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten wiederum zwei Waschschrirte: 30 Min. mit 1M NaCl in PBS, 1 Stunde mit PBS/Tween.

Die Membran wurde anschließend vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Aluminiumkästchen entnommen und auf eine Glasscheibe gelegt. Nach Vermischen von 250 µl „Enhanced luminol reagent“ und „Oxidizing reagent“ wurde dieses Gemisch auf die Membran getropft. Die Auswertung der Bindung der Antikörper an in der Probe enthaltene Proteine erfolgte durch Dokumentation der Chemilumineszenz durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilmes.

3.2.7.6 Coomassie-Färbung von Proteinen

Das Gel wurde nach Transfer 5 Min. in Coomassie-Fixierer gefärbt und anschließend in Entfärbelösung gewaschen. Nach Entfärbung wurde das Gel 10 Min. in 5%-iger Glycerollösung inkubiert und anschließend zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

3.2.7.7 Herstellung von virusähnlichen Partikeln (VLPs)

3.2.7.7.1 Gradientenreinigung von VLPs

In mit rekombinanten Baculoviren infizierte Zellkulturflaschen wurde zunächst 0,1% Proteinase-Inhibitor-Cocktail gegeben, die Zellen durch Resuspendieren und mit einem Zellschaber abgelöst und Zellen und Überstand in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 4.000 U/10 Min./4°C wurde der Überstand abgenommen. Aus einer 66%-igen Saccharose-Stocklösung erfolgte die Herstellung 30-40%-iger Saccharoselösung (w/w) in 10 mM Tris-HCl. Der Zellkulturüberstand wurde vorsichtig in SW28/27-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen auf 5-6 ml Saccharoselösung pipettiert und die gegenüberliegenden Röhrchen tariert. Das Pelletieren durch das Saccharosekissen erfolgte für drei Stunden bei 25.000 U mit einem SW28-Rotor in einer Ultrazentrifuge. Nach dem Lauf wurde der Überstand abgesaugt und die Pellets mit 1 ml TEN-Puffer resuspendiert. Die resuspendierten Pellets wurden 30 Sek. bei 50%-iger Intensität (100 W) auf Eis beschallt und anschließend mit CsCl-Lösung der gewünschten Konzentration vermischt. Das Gemisch wurde in SW55-Polyallomer-Röhrchen gefüllt und in 24 Stunden bei 35.000 U und 4°C ein Gradient formiert. Nach dem Lauf wurden mit einer Schlauchpumpe von unten her 500 µl-Fractionen gesammelt, deren Brechungsindex mit Hilfe eines Refraktometers gemessen und anhand einer Tabelle die entsprechende Dichte (g/cm^3) ermittelt. Fractionen, deren Dichte der der VLPs entsprachen ($1,31 \text{ g/cm}^3$ für Norovirus-VLPs (Jiang et al., 1992b), $1,33 \text{ g/cm}^3$ für PEC-VLPs (Guo et al., 2001c)) wurden elektronenmikroskopisch auf VLPs untersucht.

3.2.7.7.2 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge in ausgewählten Fractionen wurde mit Hilfe des „BC Assay protein quantitation kit“ (Fa. Uptima) nach Angaben des Herstellers berechnet. Dieses Kit ist ein kalorimetrischer Test: er basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Bindung der Proteine. BCA (Bicinchonininsäure) cheliert Cu^+ -Ionen mit hoher Spezifität, um einen wasserlöslichen violetten Farbkomplex zu bilden. Dazu wurden zunächst 25 µl verschiedener Standards, Kontrollen und der zu testenden Proben in Probenröhrchen pipettiert und 200 µl der BC Reagenzien (A und B im Verhältnis 50:1) dazu pipettiert. Nach Inkubation bei 60°C für 30 Min. wurden die Röhrchen auf Raumtemperatur gekühlt, je 100 µl in ein well einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 562 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Standardkurve wurde die Proteinkonzentration in den Proben ermittelt.

4 Ergebnisse

Die Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist die am häufigsten verwendete Methode zur Detektion von Noro- und Sapoviren (Rabenau et al., 2003; Green, 2007). Die hohe Sensitivität und Spezifität dieses Untersuchungsverfahrens machen es möglich, auch geringe Virusmengen nachzuweisen und eine Zuordnung zu den Genera bzw. den einzelnen Genogruppen zu treffen. Zusätzlich stehen die generierten PCR-Produkte für weiterführende diagnostische Methoden wie z.B. die Nukleinsäuresequenzierung zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurden schwerpunktmäßig Kot- und Organproben (Darmmaterial) von Rindern und Schweinen auf das Vorkommen von Noro- und Sapovirus RNS untersucht. Zusätzlich wurden einige Proben von kleinen Wiederkäuern sowie anderen Haus- und Wildtieren untersucht. Hier waren folgende Spezies vertreten: Affe, Alpaka, Ameisenbär, Antilope, Bongo, Damwild, Elch, Elefant, Ente, Frettchen, Hund, Kamel, Katze, Okapi, Tapir, Tiger, Pferd und Wisent. Dabei wurden zunächst Primer verwendet, die aus der Literatur stammen und in der Lage sind, das Genom aller Vertreter des jeweiligen Genus zu detektieren. Die Proben von Schweinen wurden außerdem mit Primern geprüft, die im Rahmen der Arbeit mit Hilfe des Programms PrimerExpress[®] entwickelt wurden und in der Lage sind, gezielt für porcines enterales Sapovirus der GGIII spezifische Sequenzen zu erkennen. Einige Proben von Rindern wurden ebenfalls mit eigens entwickelten spezifischen Primern untersucht, die in diesem Fall nur bovine Noroviren der Genogruppe III nachweisen können. Als Positivkontrollen für die breit reaktiven RT-PCRs wurde aus humanen Kotsuspensionen gewonnene RNS verwendet, die Norovirus bzw. Sapovirus enthielt. Für die spezifischen RT-PCRs wurde RNS von den in Giessen isolierten und nach Klonierung und Sequenzierung definierten Isolaten als Positivkontrolle eingesetzt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden zur weiteren Analyse in den bakteriellen Plasmidvektor pCR 2.1-TOPO[®] (Fa. Invitrogen) ligiert, kloniert und anschließend in denaturierenden Harnstoffgelen sequenziert. Die Nukleinsäuresequenzen von jeweils drei unabhängigen Klonen wurden miteinander verglichen und eine Konsensussequenz ermittelt. Diese Konsensussequenzen wurden mit in der Genbank publizierten Sequenzen verglichen und der Grad der genetischen Distanz berechnet (Kimura, 1980). Auf der Basis dieser Distanzen wurden mit der Neighbor-Joining Methode (Saitou und Nei, 1987) phylogenetische Bäume erstellt. Anhand dieser Bäume konnte eine Eingruppierung der in Giessen detektierten Isolate in die einzelnen Genera und weiter in Genogruppen getroffen werden.

Die in dieser Arbeit als „Isolate“ bezeichneten Viren stellen keine Virusisolate im herkömmlichen Sinn dar, da aufgrund des Fehlens eines Zellkulturmodells kein Virus angezüchtet werden konnte. Der Ausdruck Isolat steht somit im Folgenden für Viren, von denen Nukleinsäureteilstrecken amplifiziert wurden.

4.1 Detektion und Analyse von Noroviren

4.1.1 Nachweis von Norovirus RNS mit Hilfe der RT-PCR

4.1.1.1 Polymerasegen

Die Detektion von Norovirus-Nukleinsäure erfolgte mit den Primern JV12Y/JV13I (Vennema et al., 2002). Im positiven Fall wird hierbei ein 327 Basenpaare großes Fragment aus dem Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RdRp) amplifiziert.

Insgesamt wurden mit dieser PCR 546 Proben von Rindern, 132 Proben von Schweinen, 32 Proben von kleinen Wiederkäuern und 20 Proben von Tieren anderer Spezies untersucht. Eine Auflistung der Ergebnisse zeigt Tab. 21:

Proben	Rinder	Schweine	kleine Wiederkäuer	Tiere anderer Spezies
NoV positiv	32	0	0	0
NoV negativ	514	132	32	20
Gesamt	546	132	32	20

Tab. 21: Ergebnisse der mit Hilfe der Primer JV12Y/13I (Vennema et al., 2002) auf Norovirus RNS untersuchten Proben nach Tierarten.

Tab. 22 zeigt eine Auflistung der Proben, die Norovirus RNS enthielten. Insgesamt waren 32 Proben von Rindern positiv (5,9%). Die untersuchten Proben wurden nach dem Datum des Probeneinganges durchnummeriert und erhielten das Kürzel KP Rd. (Kotproben Rind) sowie eine dreistellige Zahl, die eine Identifikation der Proben erlaubt. Weitere Informationen zu den positiven Proben, die den Fragebögen bzw. den Untersuchungsanträgen entnommen wurden, sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

Die Proben, in denen Norovirus RNS detektiert werden konnte, stammten von 32 Rindern aus 19 unterschiedlichen Betrieben in acht unterschiedlichen Landkreisen Hessens sowie je einem Landkreis in Rheinland-Pfalz, Schleswig-Holstein und Sachsen-Anhalt. Mit der Ausnahme von zwei Tieren litten alle zum Zeitpunkt der Probennahme an Diarrhöe; diese zwei Tiere stammten allerdings aus einem Bestand, in dem eine Problematik mit

Kälberdiarrhöe vorlag und aus dem zwei weitere Tiere mit Durchfall positiv getestet wurden. In zwei positiven Fällen wurde Darmmaterial von verendeten Tieren untersucht, in allen übrigen positiven Fällen Kotproben.

Anhand der bei der Probennahme ausgefüllten Fragebögen bzw. der mit den Proben eingesandten Untersuchungsanträge konnten in den meisten Fällen genauere Angaben zu den betroffenen Tieren gewonnen werden. Die statistische Auswertung der zu den positiven Proben ermittelten Daten wird im Kapitel 4.1.5 beschrieben.

4.1.1.2 Kapsidgen

Fünf zufällig ausgewählte positive Kotproben von Rindern, von denen zu diesem Zeitpunkt bereits das PCR-Produkt der RdRp sequenziert worden war, wurden mit Hilfe von eigens entwickelten Primern untersucht, die den 5'-terminalen Bereich des VP1 detektieren. Dabei konnte in allen Fällen das erwartete 959 Bp große Fragment generiert werden. Die verwendeten Primer sind spezifisch für die Genogruppe III.

Abb. 10 gibt eine Übersicht über die Genomlokalisierung der Primer und zeigt Bilder von Agarosegelen der entsprechenden RT-PCR-Ergebnisse unter UV-Durchlicht.

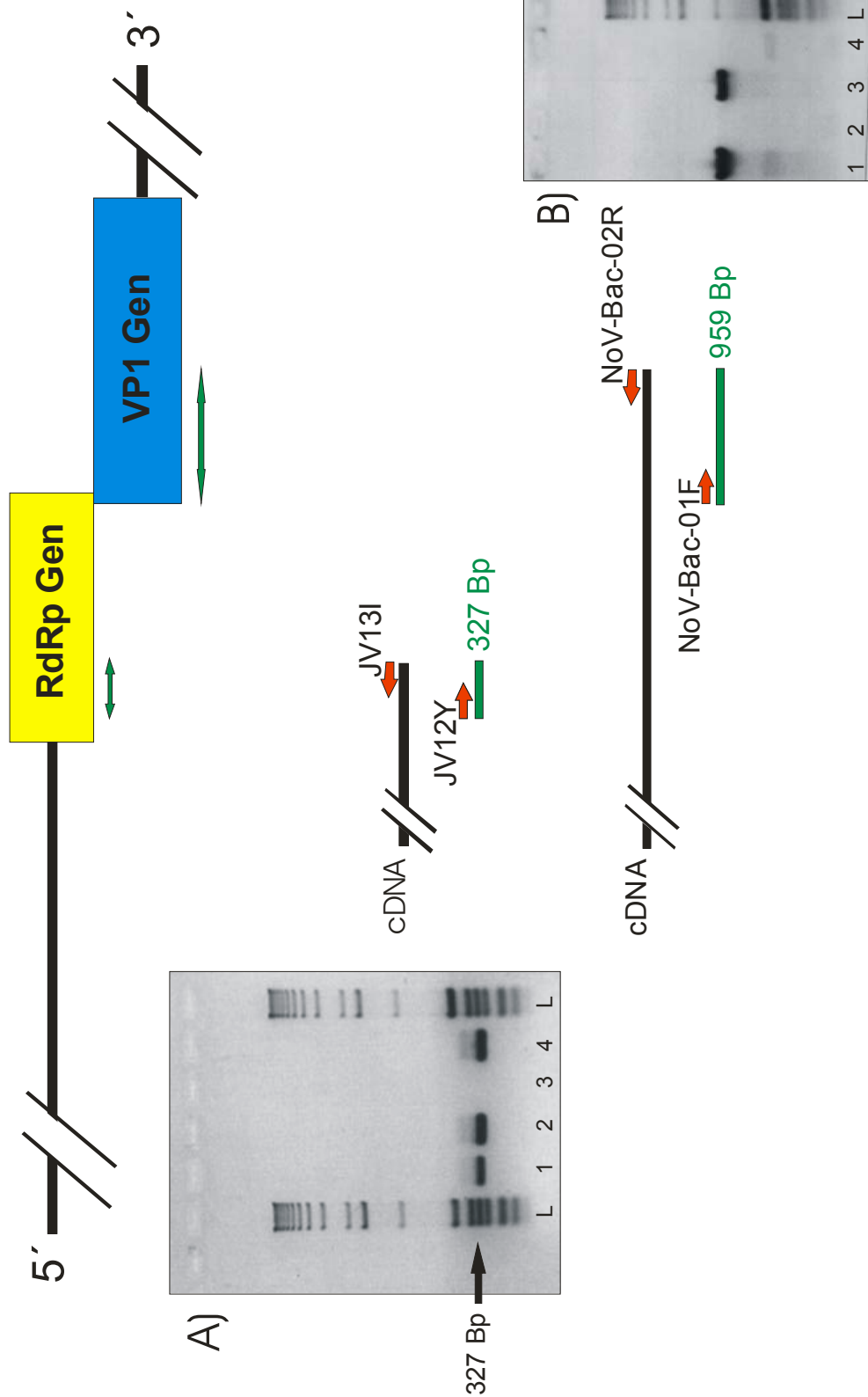


Abb. 10: RT-PCR zum Nachweis von Norovirus RNS. Lokalisation der Primerpaare JV12Y/13I sowie NoV-Bac-01F/02R.

A) Primerpaar JV12Y/13I (327 Bp) der RNS-abhängigen RNS-Polymerase. 1,5%-iges Agarosegel. L: 1 Kb Größenmarker, Spur 1 und 2: positive Proben, Spur 3: Negativkontrolle (Aqua ddPCR, mit den Proben aufgearbeitet), Spur 4: Positivkontrolle. B) Primerpaar NoV-Bac-01F/02R (959 Bp des VP1). 1,5 %-iges Agarosegel. L: 1 Kb-Größenmarker. Spur 1: Positivkontrolle. Spur 2: Negativkontrolle (Aqua ddPCR, mit den Proben aufgearbeitet), Spur 3: positive Probe, Spur 4: negative Probe. Die grünen Pfeile geben die Lokalisation der Amplifikate im jeweiligen Gen an.

ID	Alter	Herkunft Ort/ Landkreis/ Bundesland	Rinder Bestand Nr.	Bestands- probleme	Symptome Einzeltier	Material	EM- Ergebnis	Isolatname
KP004Rd. 5781/03	10 Tage	Giessen/ Giessen/HES	43	Neugeborenen- diarrhöe	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-16/2003/DE
KP008Rd. 5787/03	10 Tage	Giessen/ Giessen/HES	43	Neugeborenen- diarrhöe	Diarrhöe	Kot	Rotavirus	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-13/2003/DE
KP056Rd. 9906/03	5 Tage	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis/HES	38	Diarrhöe	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-01/2003/DE
KP057Rd. 9907/03	5 Tage	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis/HES	38	Diarrhöe	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-02/2003/DE
KP063Rd. 9914/03	-	Wächtersbach/ Main-Kinzig-Kreis/HES	17	Kälberdiarrhöe	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-05/2003/DE
KP066Rd. 10296/03	4 Tage	Giessen/ Giessen/HES	43	Diarrhöe	Diarrhöe	Kot	Rotavirus	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-17/2003/DE
KP067Rd. 10424/03	5-6 Tage	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis/HES	38	Diarrhöe	Diarrhöe, Schwäche	Kot	Rotavirus, Norovirus	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-03/2003/DE
KP085Rd. 12276/03	3 Wochen	Beselich/ Limburg-Weilburg/HES	16	Kälberdiarrhöe	Diarrhöe, prämaturn, Sepsisverdacht	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-04/2003/DE
KP100Rd. 18/25.06.03	3 Wochen	Mücke/ Vogelsbergkreis/HES	74	-	Diarrhöe, CCN, Nekrobazilliose	Kot	n.d.	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-20/2003/DE
KP104Rd. 14336/03	5 Tage	Mengerskirchen/ Limburg-Weilburg/HES	78	-	Diarrhöe, Trinkschwäche	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-12/2003/DE
KP138Rd. 18185/03	1 Woche	Giessen/ Giessen/HES	43	Diarrhöe	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-21/2003/DE
KP152Rd. 19161/03	1 Woche	Weinbach/ Limburg-Weilburg/HES	12	Diarrhöe	Diarrhöe, Apathie, Trinkschwäche	Kot	Rotavirus	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-06/2003/DE
KP170Rd. 21167/03	2 Wochen	Kronberg/ Hochtaunuskreis/HES	87	-	Diarrhöe, Trinkschwäche	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-28/2003/DE
KP173Rd. 28/19.11.03	3 Wochen	Giessen/ Giessen/HES	43	Diarrhöe	Diarrhöe, Husten	Kot	n.d.	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-22/2003/DE
KP181Rd. 21837/03	1 Monat	Giessen/ Giessen/HES	43	Diarrhöe	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-07/2003/DE
KP224Rd. 1684/04	6 Tage	Gedern/ Wetteraukreis/HES	14	Kälberdiarrhöe	Diarrhöe, Pneumonie	Kot	Rotavirus	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-08/2004/DE
KP268Rd. 5999/04	5 Tage	Hellnhahn/ Westerwaldkreis/R-P	19	-	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-23/2004/DE
KP274Rd. 6216/04	-	Meldorf/ Dithmarschen/S-H	20	-	Diarrhöe	Kot	Rotavirus	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-18/2004/DE

ID	Alter	Herkunft Ort/ Landkreis/ Bundesland	Rinder Bestand Nr.	Bestands- probleme	Symptome Einzeltier	Material	EM- Ergebnis	Isolatname
KP311Rd. 11622/04	-	Vöhl/Waldeck- Frankenberg/HES	26	-	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-25/2004/DE
KP312Rd. 11624/04	-	Vöhl/Waldeck- Frankenberg/HES	26	-	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-32/2004/DE
KP323Rd. 15421/04	10 Tage	Kinzenbach/ Giessen/HES	81	Kälberdiarrhöe	Kälberdiarrhöe, Trink- schwäche, Festliegen	Kot	Rotavirus	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-27/2004/DE
KP330Rd. 18161/04	5 Tage	Schotten/ Vogelsbergkreis/HES	173	Kälberdiarrhöe	Diarrhöe, Omphalophlebitis	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-11/2004/DE
KP357Rd. A2/20.12.04	8 Tage	Brensbach-Wallbach/ Odenwaldkreis/HES	285	Diarrhöe, Husten	gesund	Kot	n.d.	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-26/2004/DE
KP358Rd. A3/20.12.04	2 Tage	Brensbach-Wallbach/ Odenwaldkreis/HES	285	Diarrhöe, Husten	gesund	Kot	n.d.	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-30/2004/DE
KP359Rd. A4/20.12.04	8 Tage	Brensbach-Wallbach/ Odenwaldkreis/HES	285	Diarrhöe, Husten	Diarrhöe, Husten	Kot	n.d.	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-15/2004/DE
KP371Rd. 1408/05	-	Haina/Waldeck- Frankenberg/HES	225	Kälberdiarrhöe	Diarrhöe	Kot	Rotavirus	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-09/2005/DE
KP376Rd. 2498/05	4 Tage	Eschenrod/ Vogelsbergkreis/HES	173	Kälberdiarrhöe	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-10/2005/DE
KP386Rd. 3648/05	3 Wochen	Mengerskirchen/ Limburg-Weilburg/HES	78	Kälberdiarrhöe, Kälber versterben perakut	Diarrhöe, verstorben; Patho: Exsikkose, Abomasoenteritis, Tarsitis, Rhinitis	Darm	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-14/2005/DE
KP400Rd. 8/11.2.05	7 Tage	Reichelsheim- Gumpen/ Odenwaldkreis/HES	308	Diarrhöe	Diarrhöe	Kot	n.d.	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-19/2005/DE
KP409Rd. 5521/05	2 Wochen	Brensbach-Wallbach/ Odenwaldkreis/HES	285	Diarrhöe, Husten	Diarrhöe bei erhaltenem Appetit	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-31/2005/DE
KP458Rd. 18653/05	-	Schweinitz/ Anhalt-Zerbst/S-A	344	-	Diarrhöe	Kot	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-24/2005/DE
KP487Rd. 33392/05	3 Tage	Giessen/ Giessen/HES	370	Diarrhöe	Diarrhöe, Pansentrin- ken, met. Azidose; Patho: Peritonitis, Enteritis	Darm	negativ	Bo/NoV/GGIII.2/ Giessen-29/2005/DE

Tab. 22: Auflistung der in der Norovirus RT-PCR positiven Proben von Rindern.

- = keine Angabe vorhanden, n.d. = nicht durchgeführt. HES = Hessen, R-P = Rheinland-Pfalz, S-H = Schleswig-Holstein, S-A = Sachsen-Anhalt.

4.1.2 Phylogenetische Analysen

4.1.2.1 Ermittlung von Nukleinsäureteilsequenzen

Alle 32 in der Norovirus RT-PCR mit dem Primerpaar JV12Y/13I positiven Proben wurden weiter prozessiert. Die Größe der generierten PCR-Produkte lag bei 327 Bp.

Zusätzlich wurde von fünf Norovirus-positiven Proben die Nukleinsäuresequenz des 5'-terminalen Bereichs der für das Kapsidprotein VP1 kodierenden Region (959 Bp) bestimmt. Verwendet wurden dazu die Primer NoV-Bac-01F und -02R, generiert nach Sequenzvergleich verschiedener boviner Norovirusisolate mit Hilfe des Programms PrimerExpress®.

Zur Ermittlung der Nukleinsäuresequenzen wurden die erhaltenen PCR-Produkte aus dem Gel extrahiert (Abb. 11A), in den bakteriellen Plasmidvektor pCR 2.1-TOPO® (Fa. Invitrogen) ligiert, kloniert und Minipräparationen der Plasmid DNS hergestellt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation diente ein Verdau der Minipräparationen mit Endonukleasen (BamHI und EcoRV), wobei 0,1-0,2 µg Plasmid-DNS je Verdau eingesetzt wurde. Dabei waren im positiven Fall zwei Banden sichtbar: eine für den Vektor (3.871 Bp) und eine für das klonierte Fragment (Größe PCR-Fragment plus 58 Bp). Abb. 11B zeigt einen Kontrollverdau. Der obere Pfeil zeigt auf den Vektor, der untere auf das Insert in der erwarteten Größe (hier: Norovirus (Primerpaar JV12Y/13I): 385 Bp). Dabei ist in den Spuren drei und fünf jeweils ein Insert der falschen Größe zu sehen.

Jeweils drei unabhängige Klone, die nach Kontrollverdau ein Fragment korrekter Größe zeigten, wurden anschließend sequenziert. Die Nukleinsäuresequenzen dieser Klone wurden miteinander verglichen und eine Konsensussequenz ermittelt.

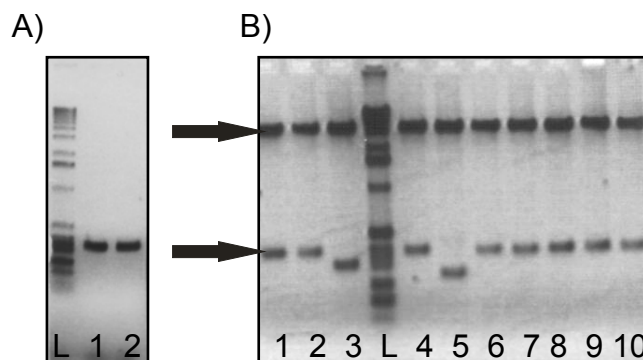


Abb. 11: Agarosegel der PCR-Produkte sowie der Minipräparationen nach Kontrollverdau.

A) Kontrolle der PCR-Produkte nach Gelextraktion. Hier: Norovirus (Primerpaar JV12Y/13I). Spur 1 und 2: extrahiertes PCR-Produkt: 327 Bp. L: 1 Kb-Größenmarker. B) Enzymverdau. Oberer Pfeil: Vektor pCR 2.1 TOPO®: 3.871 Bp. Unterer Pfeil: Insert korrekter Größe (Spuren 1, 2, 4, 6-7) (hier: Norovirus RNS-abhängige RNS-Polymerase (385 Bp)). Spuren 3 und 5: Insert falscher Größe.

Die ermittelten Konsensussequenzen wurden an die Genbank übermittelt; die entsprechenden Genbankzugangsnummern sind in Tab. 23 zusammengefasst.

Zusätzlich wurden die aus Kotsuspensionen erhaltenen humanen Positivkontrollen (PK14, PK26, PK45) kloniert und analysiert. Die Konsensussequenzen wurden ebenfalls an die Genbank übermittelt. Durch Analyse der Sequenzen dieser Proben konnte die Spezifität der verwendeten Universalprimer bestätigt werden.

Name	Proben ID	Jahr der Isolierung	Spezies	Herkunft	Genbank-Zugangsnummer RdRp	VP1
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-01/2003/DE	KP056Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122259	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-02/2003/DE	KP057Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122260	EU095410
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-03/2003/DE	KP067Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122262	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-04/2003/DE	KP085Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122266	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-05/2003/DE	KP063Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122261	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-06/2003/DE	KP152Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122273	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-07/2003/DE	KP181Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122275	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-08/2004/DE	KP224Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122250	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-09/2005/DE	KP371Rd.	2005	Rind	Hessen	EU122249	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-10/2005/DE	KP376Rd.	2005	Rind	Hessen	EU122251	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-11/2004/DE	KP330Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122269	EU095413
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-12/2003/DE	KP104Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122267	EU095411
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-13/2003/DE	KP008Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122255	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-14/2005/DE	KP386Rd.	2005	Rind	Hessen	EU122252	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-15/2004/DE	KP359Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122280	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-16/2003/DE	KP004Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122254	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-17/2003/DE	KP066Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122262	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-18/2004/DE	KP274Rd.	2004	Rind	Schleswig-Holstein	EU122257	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-19/2005/DE	KP400Rd.	2005	Rind	Hessen	EU122258	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-20/2003/DE	KP100Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122271	-

Name	Proben ID	Jahr der Isolierung	Spezies	Herkunft	Genbank-Zugangsnummer RdRp	Genbank-Zugangsnummer VP1
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-21/2003/DE	KP138Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122270	EU095412
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-22/2003/DE	KP173Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122276	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-23/2004/DE	KP268Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122256	EU095414
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-24/2005/DE	KP458Rd.	2005	Rind	Sachsen-Anhalt	EU122272	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-25/2004/DE	KP311Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122264	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-26/2004/DE	KP357Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122278	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-27/2004/DE	KP323Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122268	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-28/2003/DE	KP170Rd.	2003	Rind	Hessen	EU122274	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-29/2005/DE	KP487Rd.	2005	Rind	Hessen	EU122277	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-30/2004/DE	KP358Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122279	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-31/2005/DE	KP409Rd.	2005	Rind	Hessen	EU122253	-
Bo/NoV/GGIII.2/Giessen-32/2004/DE	KP312Rd.	2004	Rind	Hessen	EU122265	-
Hu/NoV/GGII/NL 19990014/1999/NL	PK14	1999	Mensch	Niederlande	EU122281	-
Hu/NoV/GGI/NL 20010045/2001/NL	PK45	2001	Mensch	Niederlande	EU122282	-
Hu/NoV/GGII/NL 20000047/2000/NL	PK47	2000	Mensch	Niederlande	EU122283	-

Tab. 23: Genbank-Zugangsnummern Norovirusisolate.

Genbank-Zugangsnummern der in Giessen ermittelten Sequenzen von Noroviren (RdRp und VP1) von Rindern sowie der Positivkontrollen humanen Ursprungs. Nomenklatur nach Green: Spezies, aus der das Virus isoliert wurde/Genus/Spezies (oder Genogruppe)/Isolatname/Jahr der Isolierung/Herkunftsland (Green, 2007).

4.1.2.2 Phylogenetische Analysen der Sequenzen aus dem Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RdRp)

Die zuvor ermittelten Nukleinsäureteilsequenzen aus dem Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase wurden nach der Kimura-2-Parameter-Methode paarweise mit in der Genbank publizierten Sequenzen verglichen und der Grad der genetischen Distanz berechnet (Kimura, 1980) (Daten nicht gezeigt). Auf der Basis dieser Distanzen wurden nach dem Neighbor-Joining Verfahren (Saitou und Nei, 1987) phylogenetische Bäume erstellt. Eine statistische Absicherung der Ergebnisse erfolgte durch eine Bootstrap-Analyse mit 1.000 replikativen Datensätzen (Felsenstein, 1985). Die entsprechenden Bootstrap-Werte sind an den jeweiligen Ästen vor den Verzweigungen (vom Inneren des Baumes nach außen) angegeben. Der Bootstrap zeigt die Zuverlässigkeit der einzelnen Cluster

phylogenetischer Bäume an; Verzweigungen mit Bootstrap-Werten über 95% (hier: 950, da 1.000 Replikate) werden im Allgemeinen als statistisch signifikante Verzweigungen angesehen.

In den Abbildungen der phylogenetischen Bäume wurde jeweils die gleiche farbliche Kennzeichnung verwendet: In schwarzen Lettern sind humane Isolate aus der Genbank, in blauen Lettern Isolate von Schweinen (Genbank), in grünen Lettern Isolate von Rindern (Genbank) und in roten Lettern die im Rahmen dieser Arbeit in Giessen gefundenen Isolate von Rindern beschriftet. Die als Positivkontrollen verwendeten humanen Isolate sind in brauner Schrift markiert.

Der resultierende phylogenetische Baum ist in Abb. 12 dargestellt. Dieser zeigt, dass für den Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase alle 32 in Giessen gefundenen Isolate den anderen bovinen Isolaten in Genogruppe III/2 des Genus *Norovirus* zugeordnet werden konnten. Interessanterweise sind die untersuchten Isolate enger mit dem in Großbritannien gefundenen Isolat Newbury agent-2 sowie den in den USA isolierten BECV95 und 186 verwandt als mit dem deutschen Isolat Jena, dem Prototyp der Genogruppe III/1. Abb. 13 zeigt eine Ausschnittsvergrößerung der Genogruppe III aus Abb. 12.

4.1.2.3 Phylogenetische Analysen der Sequenzen aus dem Bereich des Kapsidgens (VP1)

Von fünf der 32 Proben von Rindern wurde zusätzlich ein 739 Basenpaare großes Fragment aus dem 5'-terminalen Bereich des Kapsidproteingens VP1 mit Hilfe des Primerpaars NoV-Bac-01F und 02R amplifiziert, kloniert und sequenziert. Der aus den phylogenetischen Analysen hervorgegangene Baum ist in Abb. 14 zu sehen. Die untersuchten Isolate ordnen sich ebenfalls zusammen mit den bovinen Vertretern in der Genogruppe III/2 des Genus *Norovirus* ein.

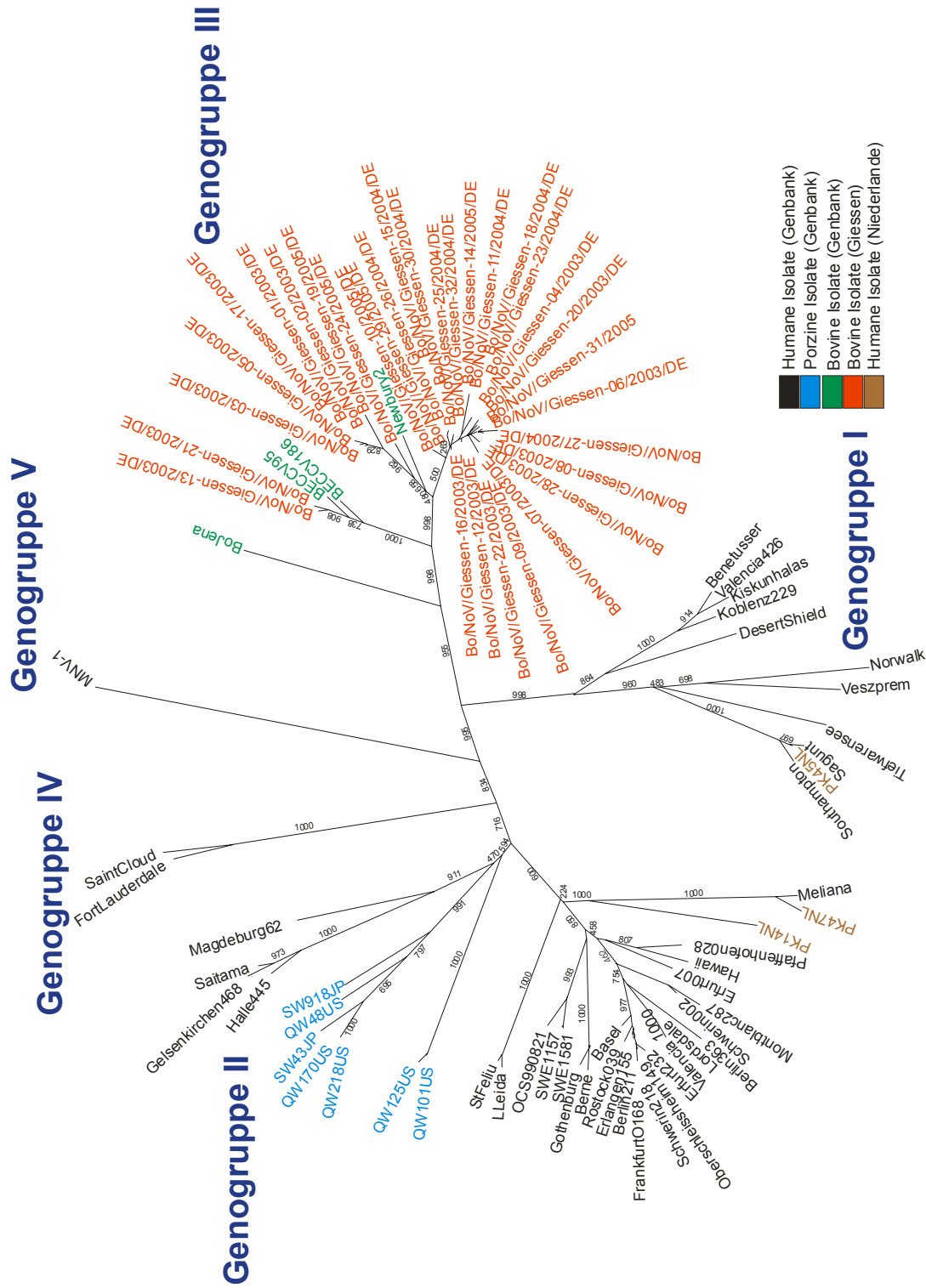


Abb. 12: Phylogenetischer Baum von Vertretern des Genus Norovirus auf der Basis von 250 Basen des RdRp Gens.
 Die in Giessen bestimmten Sequenzen sind in roten Lettern markiert. Die phylogenetischen Distanzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet; der Baum wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Zur statistischen Absicherung wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1.000 Replikaten durchgeführt; die Zahlen geben Bootstrap-Werte an. Die Astlängen sind proportional zur genetischen Distanz.

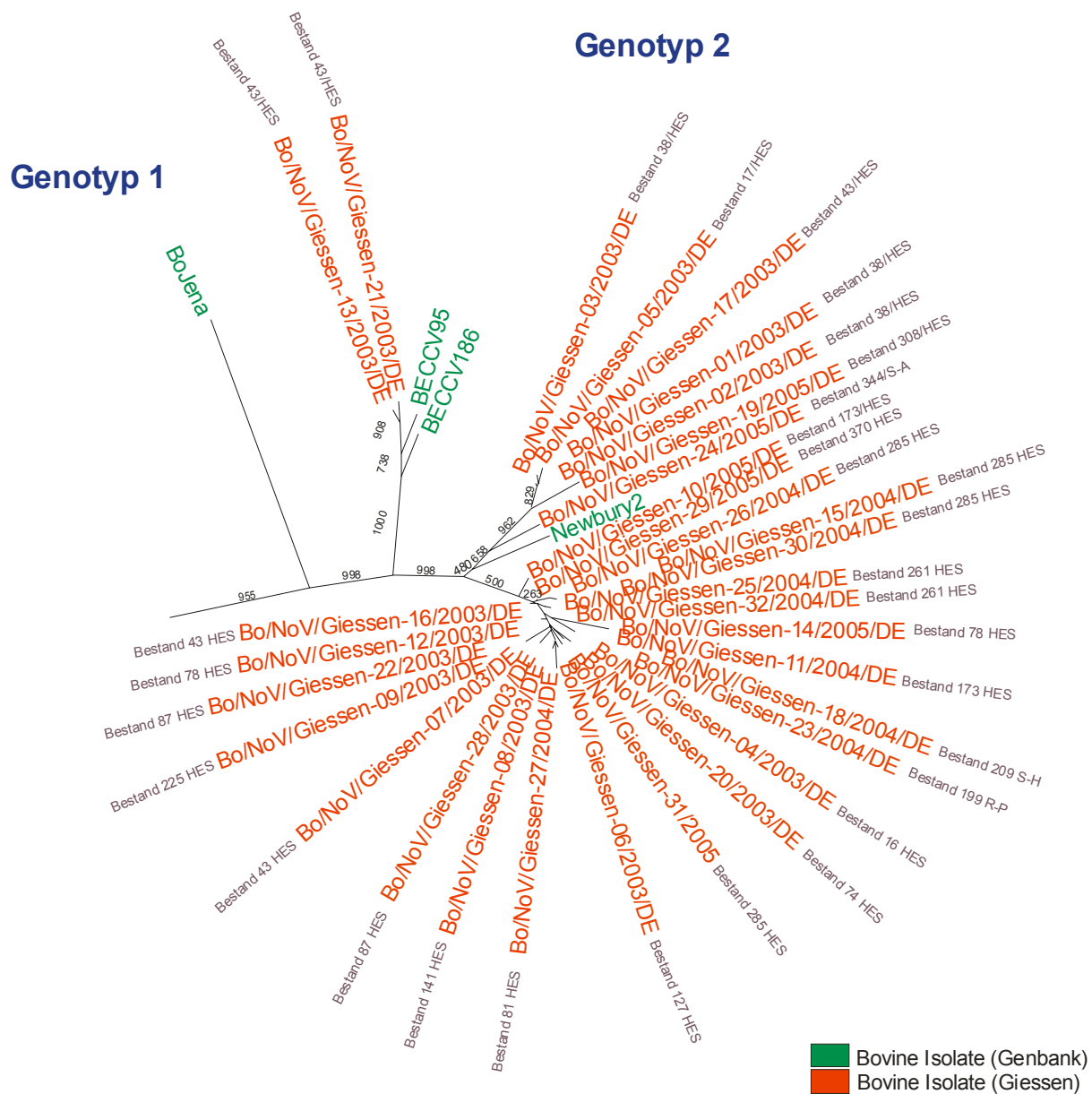


Abb. 13: Ausschnittsvergrößerung der Genogruppe III der Noroviren aus Abb. 12.

Diese Abbildung zeigt im Detail die Genogruppe III der Noroviren und wurde zur Verdeutlichung aus Abb. 12 (phylogenetischer Baum der Noroviren (RdRp)) vergrößert. Grüne Lettern kennzeichnen Sequenzen von bovinen Isolat aus der Genbank, rote Lettern die in Giessen gefundenen Isolate. Die Zahlen geben Bootstrap-Werte an. Die Bestände/Bundesländer sind neben den Isolat aufgeführt. HES = Hessen, R-P = Rheinland-Pfalz, S-A = Sachsen-Anhalt, S-H = Schleswig-Holstein.

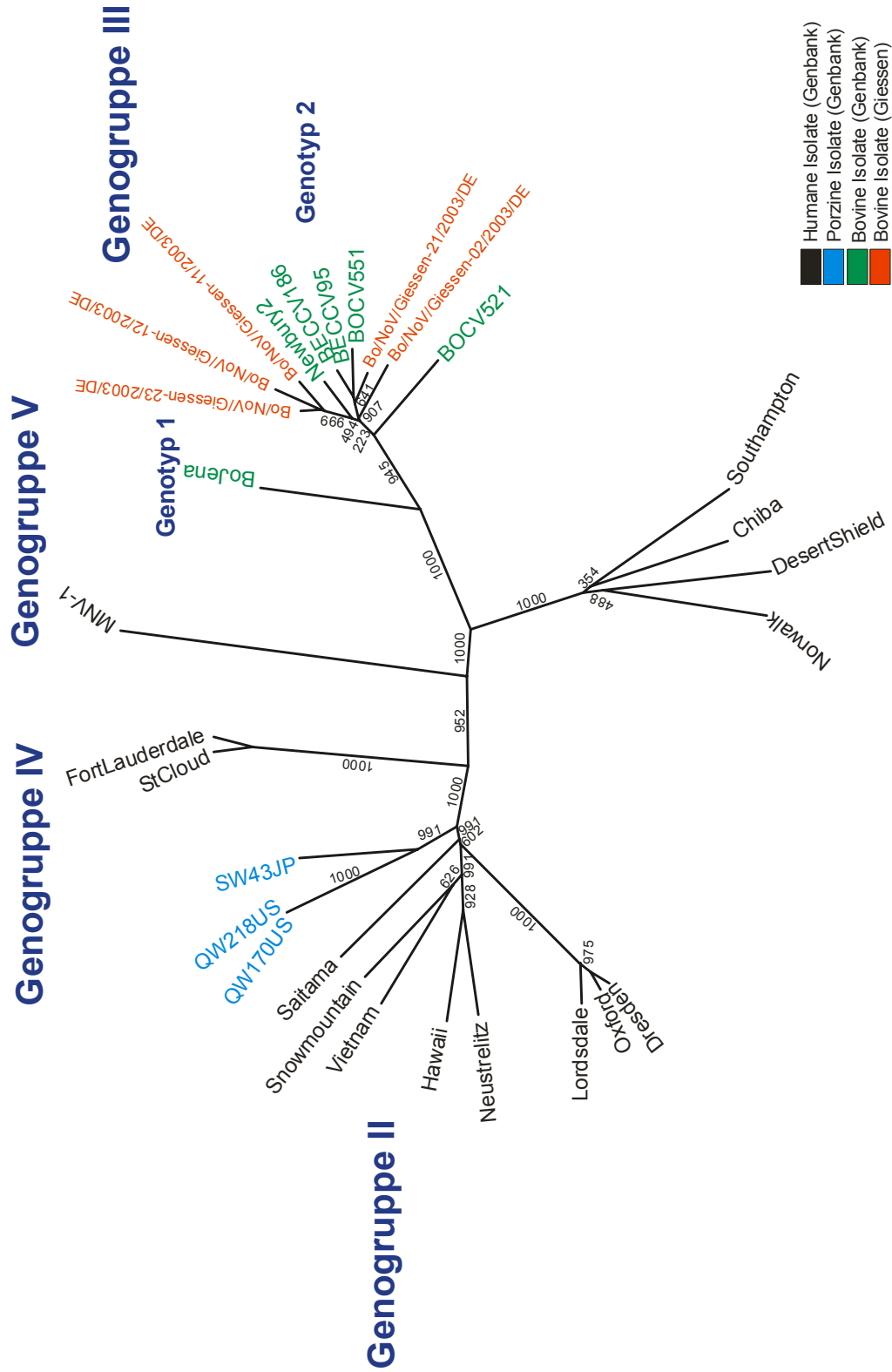


Abb. 14: Phylogenetischer Baum von Vertretern des Genus *Norovirus* auf der Basis von 739 Basen des Kapsidgens.
Die in Glessen bestimmten Sequenzen sind in roten Lettern markiert. Die phylogenetischen Distanzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet; der Baum wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Zur statistischen Absicherung wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1.000 Replikaten durchgeführt; die Zahlen geben Bootstrap-Werte an. Die Astlängen sind proportional zur genetischen Distanz.

4.1.2.4 Häufigkeitsverteilungen der Distanzen von Noroviren in Teilbereichen der für die RNS-abhängige RNS-Polymerase und der für das Kapsid kodierenden Genombereiche

Neben der erfolgten Einordnung bestimmter Sequenzen in einzelne Genera, Genogruppen und Genotypen anhand der Topologie eines phylogenetischen Baumes ist auch eine Gruppierung anhand der genetischen Distanzen, ausgedrückt als prozentualer Anteil von Nukleotidunterschieden, möglich. Abb. 15 zeigt die Häufigkeitsverteilungen und Distanzen der Norovirus-Sequenzen, die für die Erstellung der phylogenetischen Bäume (Abb. 12 bis Abb. 14) verwendet wurden. Die Distanzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet. Die erhaltenen Werte wurden zunächst in Klassen (5 – 50 bzw. 5 – 55) eingeteilt. Mit Hilfe des Programmes Excel (Fa. Microsoft) wurde die Häufigkeitsverteilung ermittelt und graphisch dargestellt.

Eine eindeutige Trennung der untersuchten Isolate nach Genogruppen konnte nur für den untersuchten Bereich des Kapsidgens gezeigt werden (Abb. 15 B). Hier lagen die Distanzen innerhalb der Genogruppen bei 0 bis 31,15 Austauschen pro 100 Basen, zwischen den Genogruppen hingegen bei 33,56 bis 48,19 Austauschen pro 100 Basen. Für den Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (Abb. 15 A) hingegen gab es keine klare Trennung zwischen den Distanzen innerhalb und zwischen den Genogruppen: der Bereich zwischen 32,0 und 38,8 Austauschen pro 100 Basen konnte sowohl innerhalb als auch zwischen den Genogruppen ermittelt werden.

Die Verteilungsmuster der Häufigkeiten lassen in beiden Fällen keine Rückschlüsse auf eine mögliche Einteilung zu.

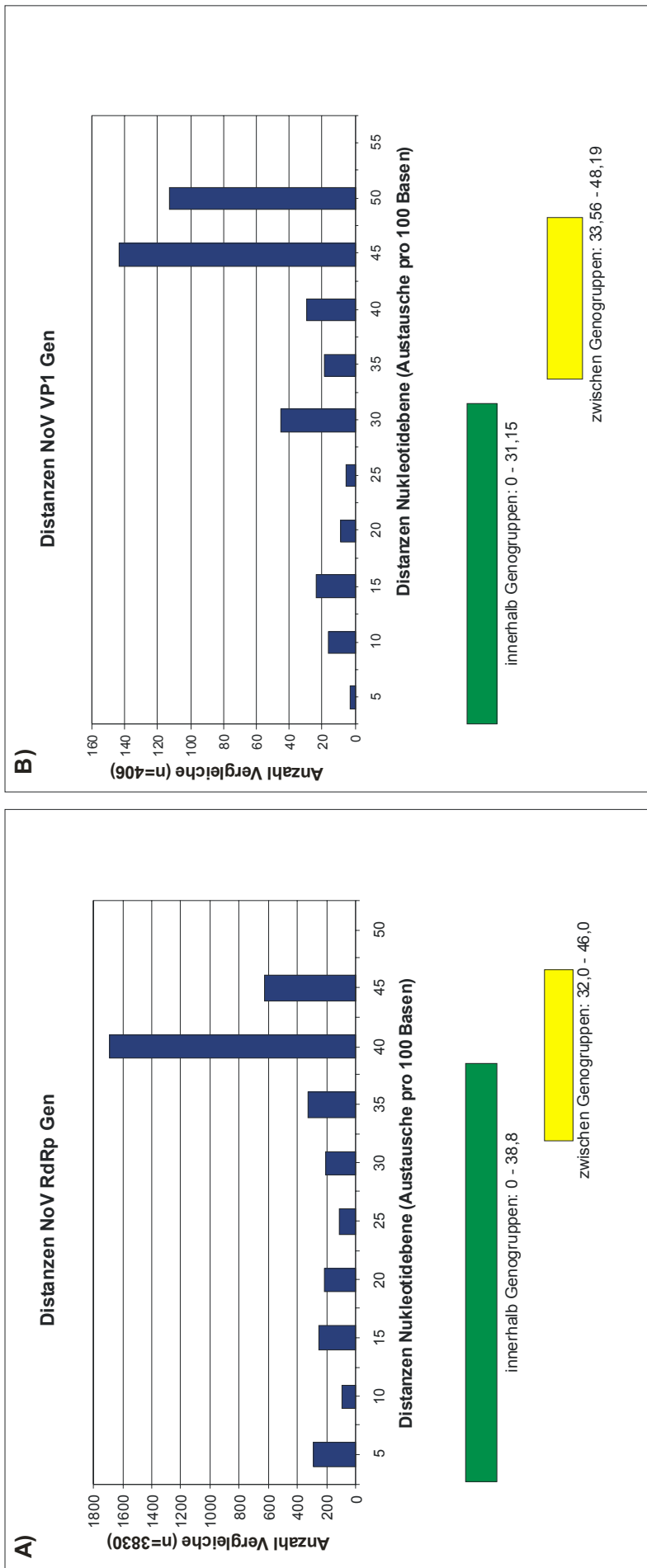


Abb. 15: Häufigkeitsverteilungen der Divergenzen von Norovirus-Sequenzen.

A) Häufigkeitsverteilung von 88 Sequenzen eines 250 B großen Fragmentes aus dem Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase und B) 29 Sequenzen eines 739 B großen Fragmentes aus dem Bereich des Kapsidgens, die für die Erstellung der phylogenetischen Bäume (Abb. 12 und 14) verwendet wurden. Die paarweisen genetischen Distanzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet und die Häufigkeitsverteilungen graphisch dargestellt. Klassenanteile 5 bis 50 bzw. 5 bis 55. Die innerhalb und zwischen den Genogruppen vorhandenen Distanzen (Minima bis Maxima) sind durch farblich markierte Balken dargestellt. Grün: Distanzen innerhalb der Genogruppen, gelb: Distanzen zwischen den Genogruppen.

4.1.2.5 Analyse nicht noroviraler Sequenzen

In der RT-PCR konnten mit den Primerpaaren JV12Y/13I und NoV-Bac-01F/02R PCR-Fragmente der scheinbar richtigen Größe generiert werden, die nach Sequenzierung jedoch keine Ähnlichkeit mit anderen Norovirussequenzen zeigten. Zusätzlich wurden PCR-Produkte analysiert, die eine offensichtlich falsche Größe zeigten. Die ermittelten Sequenzen wurden in der Genbank mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysiert. Mit BLAST wird eine Sequenz mit anderen aus der Genbank verglichen und ähnliche Sequenzen dargestellt (Altschul et al., 1990; McGinnis und Madden, 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde „BLASTN“ verwendet, das heißt, die Identifikation fand auf der Nukleinsäureebene statt.

Eine Auflistung der Ergebnisse für die falsch-positiven Proben zeigt Tab. 24.

Proben ID	Spezies	Primer-paar	Größe PCR-Fragment	BLAST-Ergebnis/ % Nukleotid-Identität
KP118Schw.	Schwein	JV12Y/13I	285 Bp	Mus musculus BAC clone RP23-285H4 von Chromosom 13 (45/66: 68%)
KP411Rd.	Rind	JV12Y/13I	293 Bp	Mus musculus BAC clone RP24-289K21 von 14 (131/246: 53%)
KP463Rd.	Rind	JV12Y/13I	280 Bp	Chromosom 1 von Pan troglodytes (Schimpanse) (72/96: 75%)
KP531Rd.	Rind	JV12Y/13I	336 Bp	Sequenz 17323 von Patent WO0170979 (Homo sapiens) (75/76: 98%)
KP213Rd., KP527Rd.	Rind	JV12Y/13I	261 Bp	Sequenz 18840 von Patent WO0170979 (Homo sapiens) 426: (79/79: 100%) 423: (125/128: 97%)
KP529Rd.	Rind	JV12Y/13I	200 Bp	Humane DNS Sequenz von Klon RP11-78B10 auf Chromosom 1 (72/96 :75%)
KP424Rd.	Rind	JV12Y/13I	337 Bp	Sequenz 1262 von Patent WO2005111217 (Nicotiana tabacum) (235/237: 99%)
KP481Rd.	Rind	JV12Y/13I	300 Bp	Pan troglodytes BAC clone CH251-540O10 von Chromosom 1 (Schimpanse) (72/96: 75%)
KP440Rd.	Rind	JV12Y/13I	274 Bp	Klon RP11-252M18 auf Chromosom 9 C (Human) (93/134: 69%)
KP166Rd.	Rind	JV12Y/13I	320 Bp	Sequenz 99 von Patent US 6476207 (unbekannter Organismus) (156/174: 89%)
KP119Rd.	Rind	JV12Y/13I	341 Bp	Zebrafish DNS von Klon CH211-261016 (49/75: 65%)

Proben ID	Spezies	Primer-paar	Größe PCR-Fragment	BLAST-Ergebnis/ % Nukleotid-Identität
KP236Rd., KP406Rd.	Rind	JV12Y/13I	341 Bp	Bacteroides thetaiotaomicron (154/239: 64%) (KP236Rd.) bzw. (186/295: 63%) (KP406Rd.)
KP464Rd.	Rind	JV12Y/13I	337 Bp	Bovines Kobuvirus Stamm U-1 (268/295: 90%)
KP498Rd.	Rind	JV12Y/13I	283 Bp	Medicago truncatula Klon mth2-99p24 (Schneckenklee) (46/69: 66%)
KP429Rd., KP363Rd.	Rind	NoV-Bac- 01F/02R	342 Bp	Maus DNS Sequenz von Klon RP24- 160E2 auf Chromosom 4 (55/82: 67%) (KP429Rd.) bzw. (54/81: 66%) (KP363Rd.)

Tab. 24: Auflistung der in der RT-PCR (Primerpaare JV12Y/13I, NoV-Bac-01F/02R) falsch positiven Proben. Die Identität auf Nukleotidebene ist angegeben in %. Beispiel: 45/66: 68% = 45 Nukleotide von 66 sind identisch (68%). Ein Amplifikat, für das BLAST eine virale Sequenz aufzeigte, ist grau hinterlegt.

In den meisten Proben wurden unspezifische Nukleinsäuren gefunden. Interessant ist, dass in einer Probe auch die RNS eines weiteren bei Rindern vorkommenden Virus gefunden wurde: in der Kotprobe KP464Rd. ließ sich eine dem Kobuvirus ähnliche Sequenz nachweisen. Kobuvirus gehört neben Aichi Virus zum Genus *Kobuvirus*, einem von sieben Genera innerhalb der Familie *Picornaviridae* und wurde in Japan aus einer Zellkultur isoliert (Genbank-Zugangsnummer AB084788) (Yamashita et al., 2003).

4.1.3 Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Noroviren

Der erste Nachweis von Noroviruspartikeln aus Kotproben erfolgte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (Kapikian et al., 1972). Dabei wurde die Immunelektronenmikroskopie unter Verwendung von Rekonvaleszentenseren eingesetzt. Aufgrund der niedrigen Sensitivität eignet sich diese Methode inzwischen nicht mehr zum routinemäßigen Nachweis dieser Viren (Glass et al., 2000b).

Bei anderen Durchfallerkrankungen ist die Elektronenmikroskopie jedoch die Methode der Wahl. Ein entscheidender Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit, eventuell aufgetretene Doppelinfektionen zu diagnostizieren („Catch-all method“). An das diagnostische Labor eingesandtes Probenmaterial, das auf virale Durchfallerreger untersucht werden soll, wird daher routinemäßig einer elektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen, so auch die in diese Arbeit eingegangenen eingesandten Kotproben von Rindern. Dabei waren von insgesamt 460 Kotproben von Rindern 372 Proben negativ. In 76 Proben konnten Rotaviruspartikel und in acht Proben Coronaviruspartikel detektiert werden. In zwei Proben konnten sowohl Rota- als auch Coronaviruspartikel detektiert werden. Eine Probe enthielt Picornaviruspartikel, eine Probe „small round structured viruses“ (SRSV).

Mit Hilfe eines humanen Antiserums gegen humane Noroviren wurde eine zuvor in der RT-PCR positiv getestete Probe immunelektronenmikroskopisch auf Noroviruspartikel untersucht. Dabei wurde das besondere Verfahren der Flüssigphasen-Immunelektronenmikroskopie verwendet, bei dem zunächst Probe und Antikörper vermischt werden und dann das Probennetzchen darauf verbracht wird. Hier erfolgt eine Bindung der Antikörper an in der Probe befindliche Partikel bereits vor der Adsorption an das Probennetzchen. Die dadurch resultierende Aggregatbildung erleichtert dem Untersucher die Detektion von Viruspartikeln.

Abb. 16 zeigt ein elektronenmikroskopisches Bild zweier Noroviruspartikel aus der Kotprobe eines Rindes (Negativkontrastierung). Die typischen kelchartigen Vertiefungen auf der Oberfläche der Virionen fehlen den Noroviren; dies erschwert eine elektronenmikroskopische Diagnose.

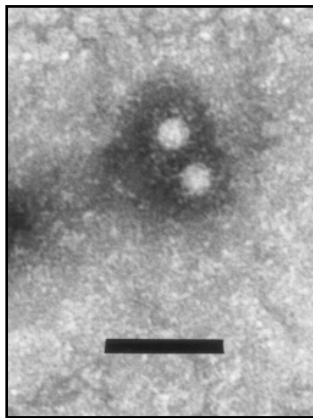


Abb. 16: Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Noroviruspartikeln.

Detektiert in der Kotprobe eines mit Noroviren infizierten Rindes (KP067Rd., zuvor positiver Norovirus-Nachweis mittels RT-PCR). Negativkontrastierung mit 2% Methylaminowolframat. Flüssigphasen-Immunelektronenmikroskopie mit einem humanen Antiserum gegen humane Noroviren. Balken: 100 nm.

4.1.4 Infektion boviner und oviner Zellen

Die Infektion boviner und oviner Zellen mit aufgearbeitetem Darmmaterial erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik. Die Zellkulturplatten wurden eine Woche lang täglich auf zytopathogene Effekte mikroskopisch betrachtet. Der Überstand der Vertiefungen, die einen zytopathischen Effekt aufwiesen, wurde nachfolgend elektronenmikroskopisch oder in einer PCR weiter untersucht.

Noroviren lassen sich mit Ausnahme des murinen Norovirus I (Wobus et al., 2004) bislang nicht in Zellkultur anzüchten (Duizer et al., 2004b). Über Versuche, bovine Noroviren zu kultivieren, wurde in der Literatur bislang nicht berichtet. Daher wurde eine Infektion mit sterilfiltriertem Überstand von zwei in der Norovirus RT-PCR positiven Kotproben durchgeführt. Norovirus RNS war zwar bis zum 10. Tag p.i. in der RT-PCR nachweisbar; es konnte jedoch kein zytopathischer Effekt beobachtet werden. Auch erschien die Menge an

RNS nicht höher als im 0-Stunden-Wert. Dies wurde jedoch nicht durch quantitative Analysen wie z.B. die Real Time RT-PCR bestätigt, sondern nur anhand der Bandenintensität auf dem Agarosegel abgeschätzt. Nach zehn Tagen wurden die mit Norovirus infizierten Zellkulturen verworfen.

4.1.5 Statistische Auswertung

Die Einträge der bei der Probennahme ausgefüllten Fragebögen bzw. der von den Untersuchungsanträgen übernommenen Informationen wurden auf Zusammenhänge im Hinblick auf die Ergebnisse der RT-PCR untersucht. Dazu mussten zunächst die Proben von Rindern eingeteilt werden in eingesandte Proben und solche, die extra für diese Studie gesammelt worden waren. Diese Unterteilung war notwendig, da die bewusst im Rahmen der Fragebogenaktion gesammelten Proben nicht mit den zufällig eingesandten Proben gemeinsam analysiert werden konnten. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 0,05$ angesetzt; d.h. p-Werte, die $\leq 0,05$ lagen, zeigten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Noroviren und dem entsprechenden Parameter.

Die Rohdaten, die der statistischen Auswertung zu Grunde lagen, sind im Anhang tabellarisch aufgelistet.

4.1.5.1 Eingesandte Kot- und Organproben von Rindern

Zu dieser Gruppe gehörten 463 Rinder, von denen Kot- oder Organproben zur diagnostischen Untersuchung eingesandt worden waren. In 26 dieser Proben konnte Norovirus-RNS detektiert werden (5,6%). Die Angaben auf den Einsendeformularen wurden anonymisiert und in eine Tabelle übertragen. Dazu gehörten die Angaben Alter, Rasse, Herkunft, Bestandsinformationen sowie die Anamnese des Einzeltieres und das Datum der Probenentnahme. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen wie Elektronenmikroskopie und RT-PCR notiert. Die statistische Auswertung dieser Daten im Hinblick auf das Vorkommen von Noroviren ist in den folgenden Unterkapiteln genauer beschrieben.

4.1.5.1.1 Jahreszeitliche Verteilung

Zur Einteilung in Jahreszeiten wurden die klimatischen Jahreszeiten (Winter: Januar-März, Frühling: April-Juni, Sommer: Juli-September, Herbst: Oktober-Dezember) gewählt.

Zur virologischen Diagnostik eingesandte Kotproben wurden vorwiegend in den klimatischen Wintermonaten entnommen (Januar – März). Die Erfassung der Proben erfolgte von März 2003 bis Mitte April 2006; dadurch wurde diese Statistik zu Gunsten der Jahreszeiten Winter und Frühling beeinflusst.

Die nachfolgende Grafik zeigt die Verteilung der Proben auf die Jahreszeiten. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,31 für einen Zusammenhang mit in der PCR

positiven Proben (nicht signifikant). Es bestand also kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Norovirusinfektion und der Jahreszeit.

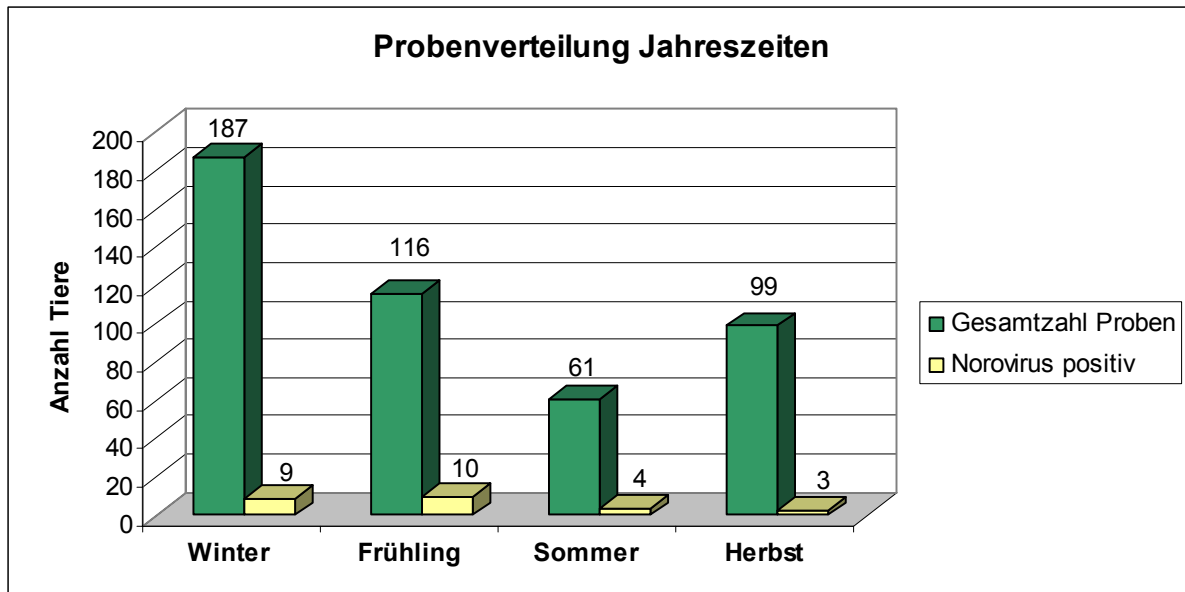


Abb. 17: Probenverteilung der eingesandten Proben von Rindern nach Jahreszeiten sowie positivem Norovirusgenomnachweis.

4.1.5.1.2 Alter/ Rasse/ Geschlecht/ Herkunft

Alter: Das Alter der Rinder, von denen Kot- bzw. Organproben eingesandt wurden, lag zwischen null Tagen (Totgeburt) und neun Jahren, wobei die jüngeren Tiere wesentlich häufiger vertreten waren. Unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Testes wurde ein p-Wert von 0,037 ermittelt; d.h. die Norovirus-positiven Tiere waren statistisch signifikant jünger als die negativ getesteten Tiere. In der nachfolgenden Grafik wird die Altersverteilung in einem Box-and-Whisker-Plot veranschaulicht. Von 76 Tieren lag keine Altersangabe vor, darunter sechs positive Tiere.

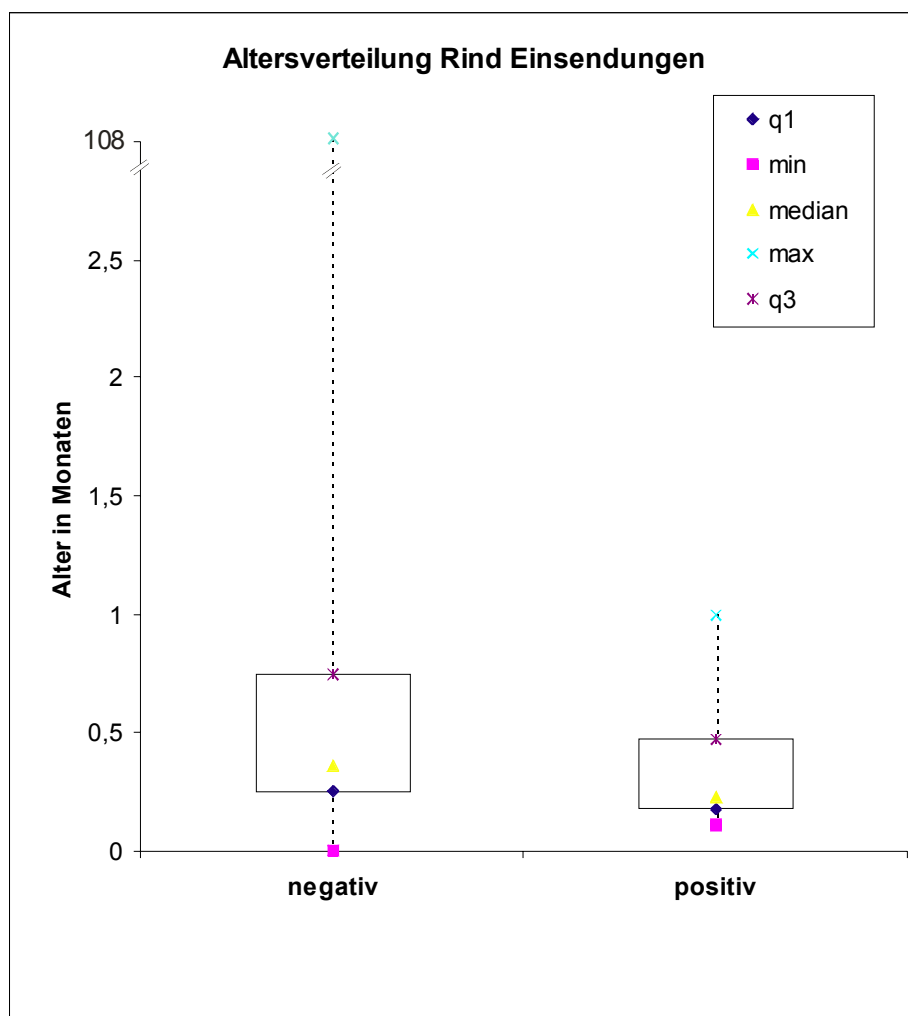


Abb. 18: Altersverteilung der eingesandten Proben von Rindern (Alter in Monaten).

Darstellung im Box-and-Whisker-Plot. q1 = 1. Quartil, q3 = 3. Quartil, min = kleinster Wert, max = größter Wert.

Rasse: Angaben zur Rasse waren in 304 Fällen vermerkt. Insgesamt waren acht verschiedene Rassen sowie 14 Kreuzungen vertreten, die zur statistischen Auswertung in Milch- und Fleischrassen zusammengefasst wurden. Ein signifikanter Zusammenhang zum Vorliegen einer Norovirusinfektion wurde nicht ermittelt ($p = 0,31$).

Geschlecht: Das Geschlecht war in 332 Fällen angegeben. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,65 (nicht signifikant).

Herkunft: 353 der untersuchten Proben stammten aus Hessen. Die übrigen vertretenen Bundesländer sowie das europäische Ausland wurden in Gruppen zusammengefasst. In sechs Fällen war die Herkunft unbekannt. Der exakte Test nach Fisher zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zum Vorliegen einer Norovirusinfektion ($p = 0,89$).

4.1.5.1.3 Symptome Einzeltier

Diarrhöe: Fast alle untersuchten Proben (445) stammten von Tieren, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme an Diarrhöe litten; in fünf Fällen fehlte diese Information. Der zweiseitige exakte Test nach Fisher zeigte allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zum Vorliegen einer Norovirusinfektion ($p = 1,0$).

Weitere Symptome: 160 Tiere litten an weiteren Symptomen, wobei Mehrfachnennungen möglich waren (Abb. 19). Hauptsächlich vertreten waren dabei Störungen des Allgemeinbefindens und weitere Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes neben Diarrhöe. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zum Vorliegen einer Norovirusinfektion konnte nicht gezeigt werden. Die p-Werte sind der zusammenfassenden Tabelle (Tab. 25) am Ende dieses Kapitels zu entnehmen.

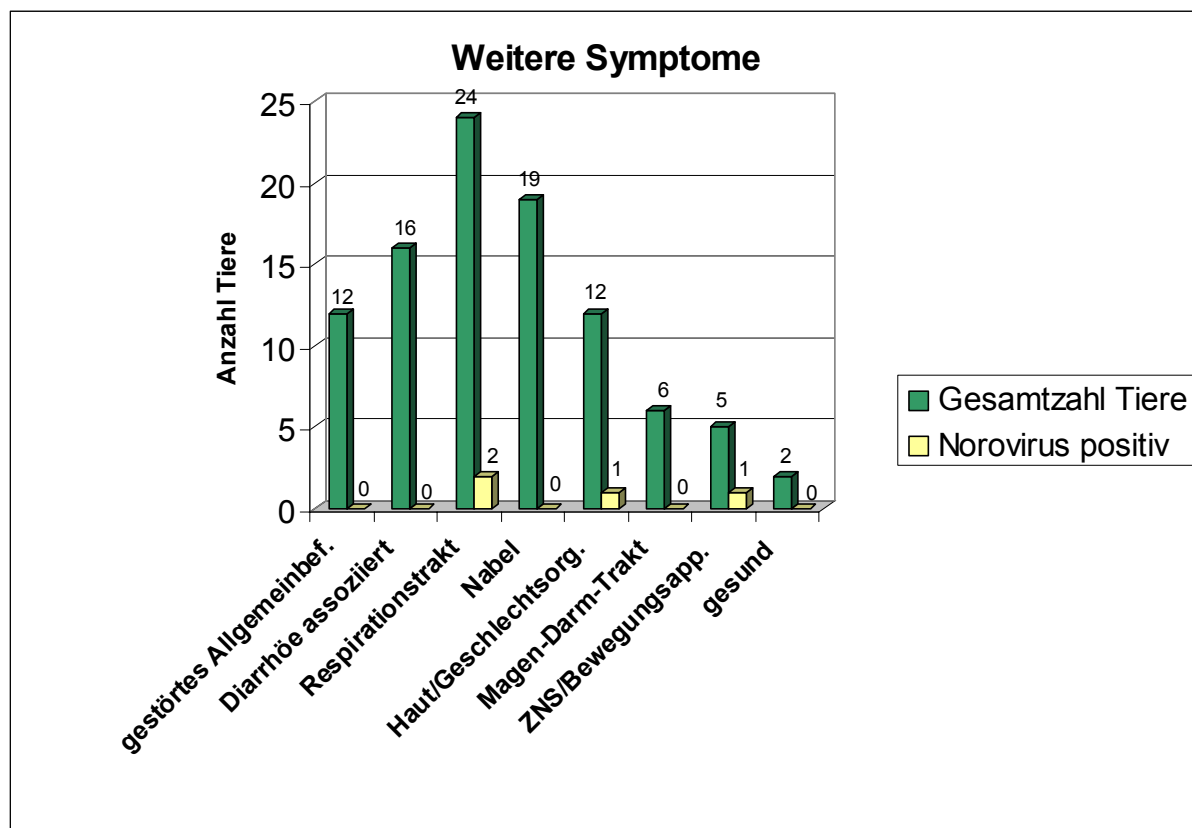


Abb. 19: Symptomgruppen/Organsysteme, die bei den beprobten Tieren vorlagen/betroffen waren (eingesandte Proben).

Mehrfachnennungen waren möglich. Das Symptom Diarrhöe ist hier nicht aufgeführt. Zu den Diarrhöe-assoziierten Erkrankungen gehören Anorexie, Exsikkose, Trinkschwäche und Festliegen. Allgemeinbef. = Allgemeinbefinden, Bewegungsapp. = Bewegungsapparat.

Rota-/Coronavirusinfektion: 460 Proben wurden elektronenmikroskopisch auf das Vorliegen einer Rota-/Coronavirusinfektion untersucht. Dabei ergab sich für das Vorliegen einer Coronavirusinfektion kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit positivem Norovirus-Nachweis ($p = 1,0$); das gleichzeitige Vorliegen einer Norovirus- und einer Rotavirusinfektion war hingegen nur knapp nicht statistisch signifikant ($p = 0,053$).

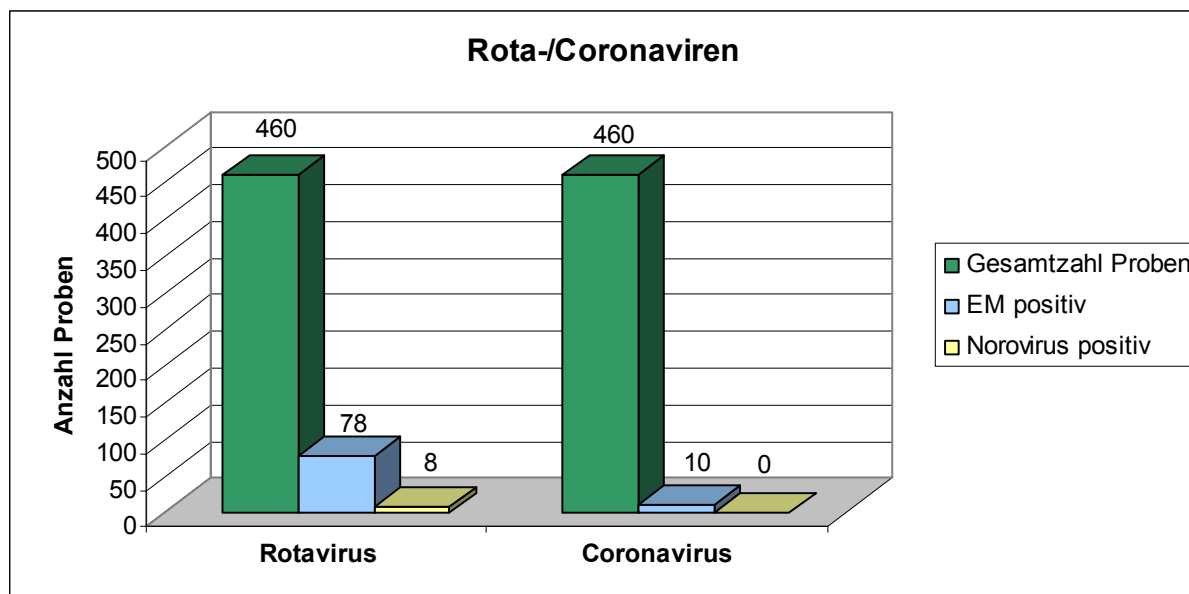


Abb. 20: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Rota- und Coronaviren im Hinblick auf die Gesamtprobenzahl sowie das gleichzeitige Auftreten von Norovirusinfektionen.

Drei Proben wurden nicht elektronenmikroskopisch untersucht.

Pathologisch-anatomische Diagnosen: 115 Proben stammten aus Organproben von Tieren, die zuvor im Institut für Pathologie seziert wurden. Davon waren zwei positiv in der RT-PCR. Die pathologischen Befunde auf den Untersuchungsanträgen wurden übernommen und hinsichtlich eines Zusammenhanges zu einer Infektion mit Noroviren untersucht. Eine Auflistung der pathologischen Befunde zeigt Abb. 21. Alle ermittelten p-Werte lagen oberhalb des Signifikanzniveaus.

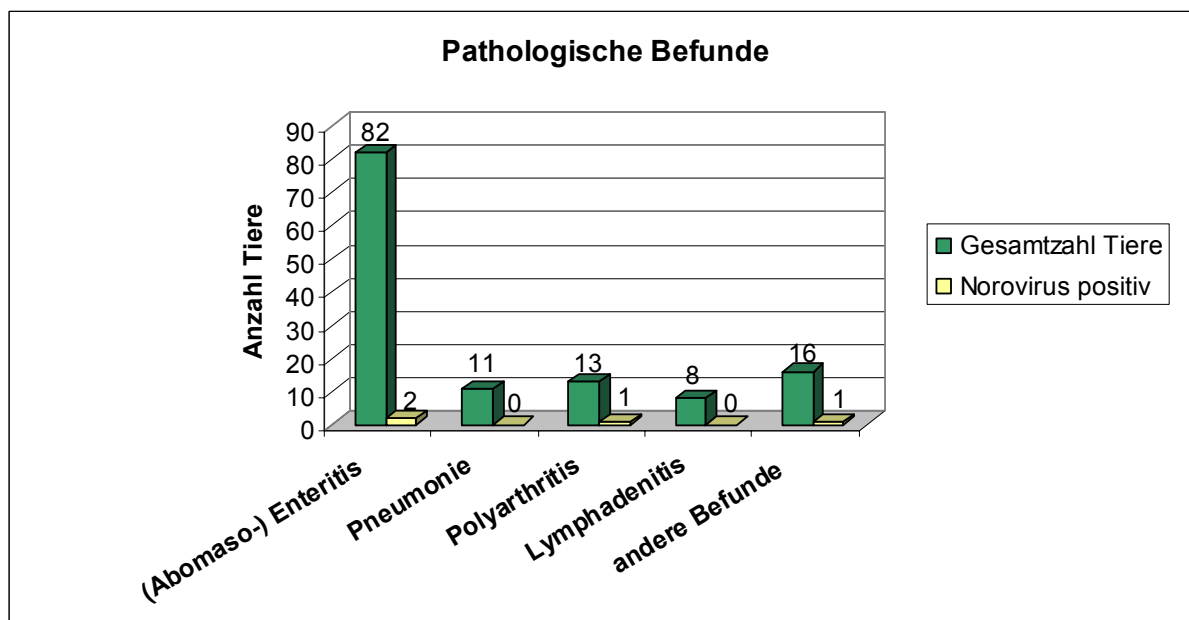


Abb. 21: Pathologisch-anatomische Diagnosen.

Mehrfachnennungen waren möglich. Insgesamt wurden 115 Proben von Rindern eingesandt, die zuvor seziert worden waren. Von 104 wurden bei Einsendung die pathologisch-anatomischen Diagnosen übermittelt.

4.1.5.1.4 Angaben zum Bestand

254 Tiere stammten aus Beständen, in denen zum Zeitpunkt der Probenentnahme Probleme mit Diarrhöe bestanden. Diese Angabe wurde statistisch nicht ausgewertet, da andere Bestandsprobleme oder auch die Freiheit von Bestandsproblemen aus den Untersuchungsvordrucken nicht ersichtlich waren.

4.1.5.2 Fragebogenaktion Rind

Zu dieser Gruppe gehören 83 Rinder, die im Rahmen der Fragebogenaktion beprobt wurden. In den Kotproben von sechs dieser Rinder konnte Norovirus-RNS detektiert werden (7,2%). Die auf den Fragebögen notierten Angaben wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und die Einzelinformationen im Hinblick auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang zu dem positiven Norovirusgenomnachweis untersucht.

4.1.5.2.1 Jahreszeitliche Verteilung

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Verteilung der Norovirus-positiven Proben sowie die Gesamtzahl der in den verschiedenen Jahreszeiten gesammelten Proben. Der mit dem zweiseitigen exakten Test nach Fisher errechnete p-Wert lag bei 0,014, d.h. es gab einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Noroviren und der Jahreszeit (Herbst und Winter).

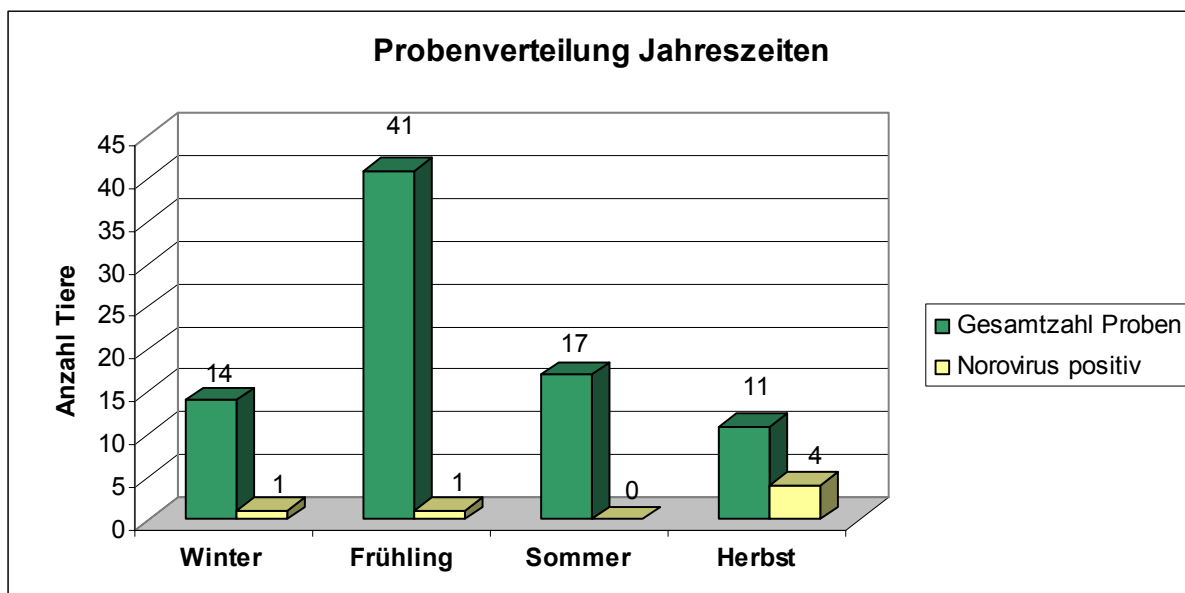


Abb. 22: Jahreszeitliche Verteilung der Proben von Rindern (Fragebogenaktion) und des positiven Norovirusgenomnachweises.

4.1.5.2.2 Alter/ Rasse/ Geschlecht/ Herkunft

Alter: Auch die Altersverteilung der Rinder von Proben, die im Rahmen der Fragebogenaktion gesammelt wurden, zeigen im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test einen statistisch signifikanten Wert ($p = 0,043$); d.h. auch hier sind die positiv getesteten Tiere signifikant jünger als die negativ getesteten. Abb. 23 zeigt die Altersverteilung in einem Box-and-Whisker-Plot.

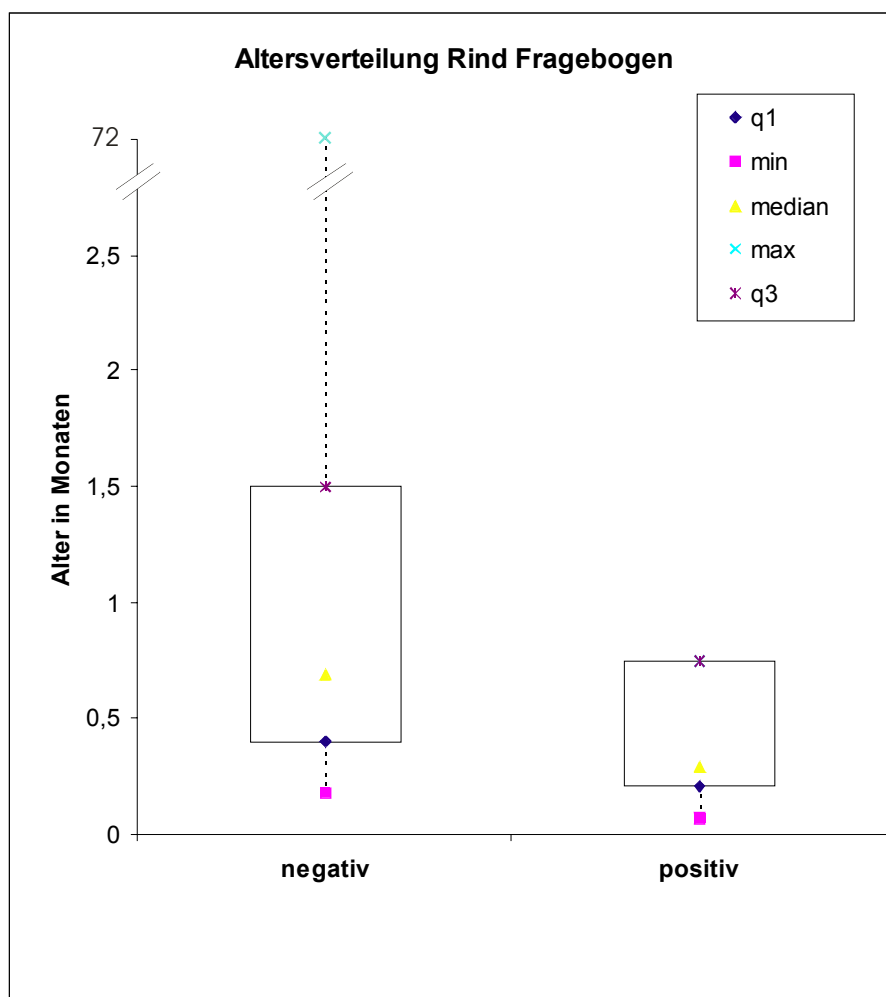


Abb. 23: Altersverteilung der Proben von Rindern der Fragebogenaktion.

Darstellung im Box-and-Whisker-Plot. q1 = 1. Quartil, q3 = 3. Quartil, min = kleinster Wert, max = größter Wert.

Rasse: Die Rasse der Tiere war in 77 Fällen angegeben. Auch hier wurden die verschiedenen Rassen und Kreuzungen zu Milch- und Fleischrassen zusammengefasst. Der p-Wert lag bei 0,604 (nicht signifikant).

Geschlecht: Angaben zum Geschlecht lagen in 79 Fällen vor. Das Geschlecht zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Vorkommen von Noroviren ($p = 0,39$).

Herkunft: 77 Proben stammten aus Hessen, die übrigen aus Rheinland-Pfalz, dem Saarland, Baden-Württemberg, Bayern, Nordrhein-Westfalen sowie Niedersachsen. Die

sechs positiven Proben stammen alle aus Hessen. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang war nicht vorhanden ($p = 0,68$).

4.1.5.2.3 Betriebsform/Bestandsprobleme

Bestandsgröße: Die Bestandsgröße war in 61 Fällen angegeben und lag zwischen vier und 170 Tieren. Der exakte Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergab einen p-Wert von 0,067; d.h. Betriebe mit einer größeren Anzahl Tiere waren knapp nicht signifikant häufiger von einer Norovirusinfektion betroffen als Betriebe mit weniger Tieren.

Betriebsform: 50 der 64 Proben, zu denen Daten über die Betriebsform vorlagen, stammten aus Betrieben, die der Kälberaufzucht dienen (Kälberaufzucht, Mutterkuhhaltung, Ammenkuhhaltung). Sechs Proben stammten aus Milchviehbetrieben bzw. Zuchtbetrieben. Sechs Proben (darunter eine positive Probe) die aus einem Kliniksbetrieb stammten, wurden nicht in die statistische Auswertung einbezogen, da die Kliniken keinen Bestand im eigentlichen Sinne darstellen. Bei einer positiven Probe fehlten Angaben der Betriebsform. Der zweiseitige exakte Test nach Fisher ergab einen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p = 0,0028$) zwischen dem Auftreten von Norovirusinfektionen und den Betriebsformen Zucht- und Milchviehhaltung.

Haltung der Kälber: Des Weiteren wurden zusätzliche mögliche Einflüsse (Gruppen-/ Einzelhaltung, Einstreu/keine Einstreu) untersucht. Die Haltung der Kälber, zu der in 15 Fällen keine Daten vorlagen, zeigte keinen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,55$) zu einer Norovirusinfektion, ebenso die Verwendung von Einstreu, zu der es in 16 Fällen keine Daten gab ($p = 1,0$).

Bestandsprobleme: 39 Tiere stammten aus Beständen, in denen keine Durchfallproblematik in der Anamnese festgestellt werden konnte. Davon war ein Tier positiv in der Norovirus RT-PCR. Die restlichen 44 Tiere stammten aus Beständen mit einer Durchfallproblematik (fünf positive Tiere). Der mit Hilfe des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher berechnete p-Wert zeigte jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Bestandsproblem Durchfall und dem Vorliegen einer Norovirusinfektion ($p = 0,207$).

Die p-Werte für folgende weitere Bestandsprobleme zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zum Vorliegen einer Norovirusinfektion: Mastitiden ($p = 1,0$), Anorexie ($p = 0,27$) und die Fälle, in denen verschiedene Organsysteme betroffen waren ($p = 1,0$).

Statistisch signifikant hingegen war der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Atemwegsproblemen ($p = 0,0029$) und dem Nachweis von Noroviren sowie dem Auftreten von Todesfällen im Bestand und dem Nachweis von Noroviren ($p = 0,029$). Die folgende

Grafik gibt eine Übersicht über die in den Beständen aufgetretenen Bestandsprobleme (Mehrfachnennungen möglich).

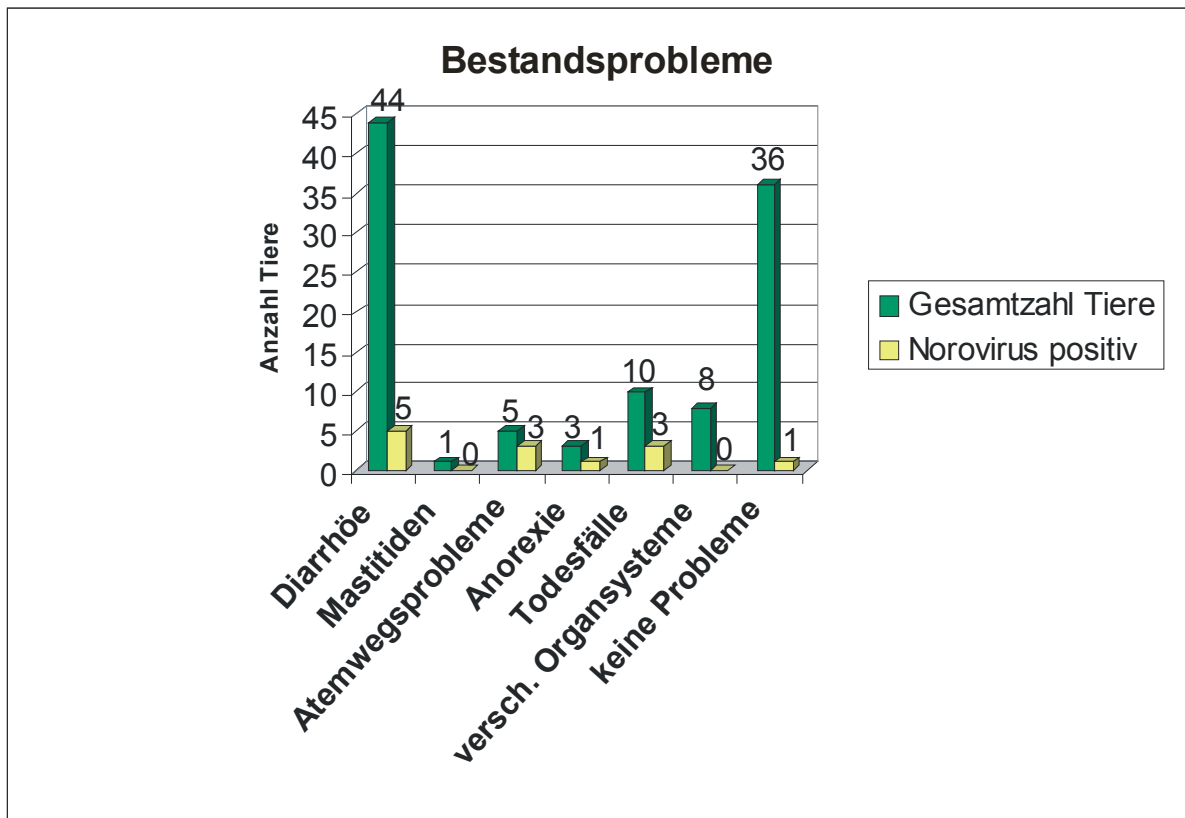


Abb. 24: Bestandsprobleme in den im Rahmen der Fragebogenaktion beprobten Beständen.
Mehrfachnennungen waren möglich.

4.1.5.2.4 Symptome der Einzeltiere

51 der 83 Tiere litten zum Zeitpunkt der Probennahme an Diarrhöe, darunter waren vier der sechs positiven Tiere in dieser Gruppe. Der p-Wert lag hier bei 0,79 (nicht signifikant).

Darüber hinaus wurden die weiteren Symptome der Einzeltiere dieser Gruppe den betroffenen Organsystemen zugeordnet und auf Zusammenhänge hin untersucht. Die nachfolgende Grafik zeigt die jeweilige Gesamtanzahl der betroffenen Tiere sowie der positiven Tiere, die an den jeweiligen Symptomen litten. Die statistische Auswertung ergab in keinem Fall einen signifikanten Zusammenhang.

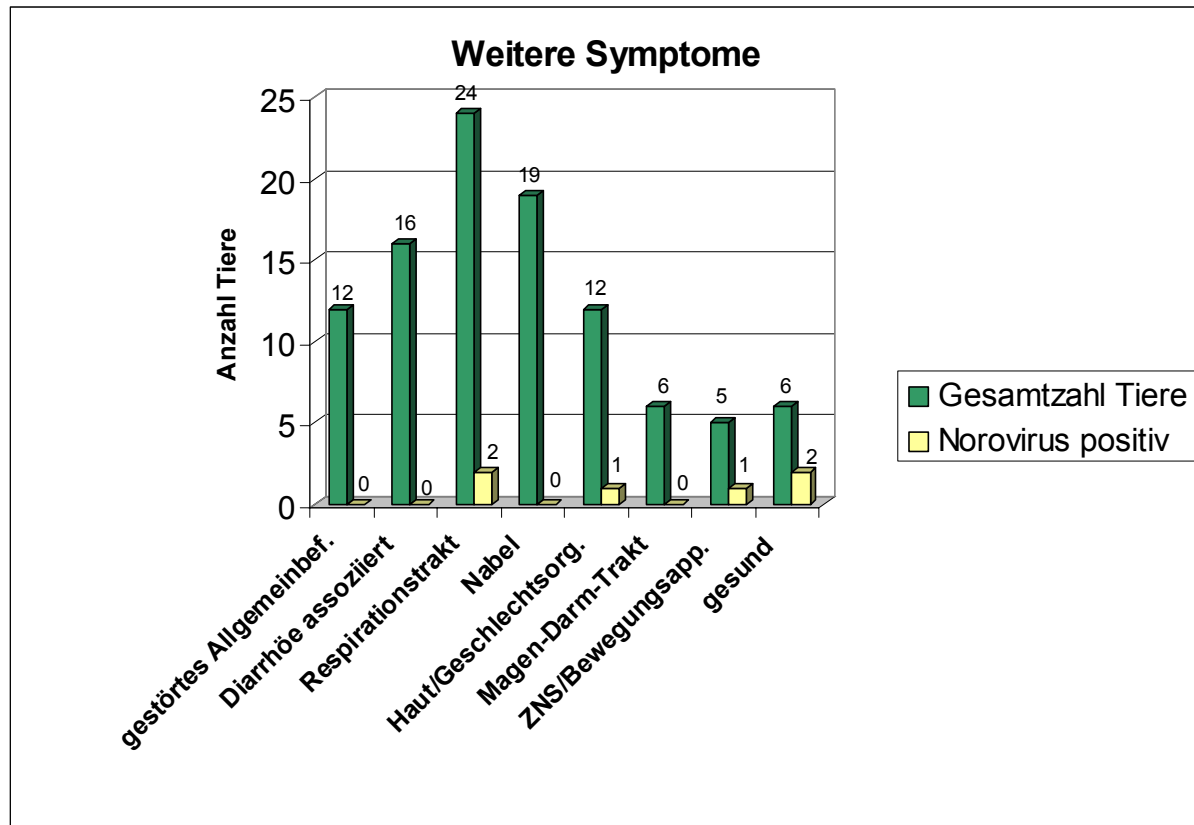


Abb. 25: Symptomgruppen/Organsysteme, die bei den beprobten Tieren vorlagen/betroffen waren. Mehrfachnennungen waren möglich. Das Symptom Diarrhöe ist hier nicht aufgeführt (fünf Tiere zeigten neben Diarrhöe keine weiteren Symptome). Zu den Diarrhöe-assoziierten Erkrankungen gehören Anorexie, Exsikkose, Trinkschwäche und Festliegen.

4.1.5.3 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse

Zum Abschluss der statistischen Auswertung sind in der nachfolgenden Tabelle alle untersuchten Parameter tabellarisch den verschiedenen untersuchten Gruppen zugeordnet und die entsprechenden p-Werte aufgelistet. Grau hinterlegt sind dabei die statistisch signifikanten Werte.

Parameter	Einsendungen Rind (NoV)	Fragebogenaktion Rind (NoV)
Jahreszeit	0,31	0,014
Alter	0,037	0,043
Rasse	0,31	0,604
Geschlecht	0,65	0,39
Herkunft	0,89	0,68
Symptome Einzeltier/ betroffene Organsysteme		
• Diarrhöe	1,0	0,79
• Störung Allgemeinbefinden	0,51	0,59
• Diarrhöe assoziiert	0,309	0,21
• Respirationstrakt	0,79	0,804
• Nabelerkrankungen	0,48	0,17

Parameter	Einsendungen Rind (NoV)	Fragebogenaktion Rind (NoV)
• Haut/gynäkologische Erkrankungen	0,57	1,0
• Magen-Darm-Trakt	0,23	1,0
• ZNS/ Bewegungsapparat	0,85	0,32
Pathologisch-anatomische Diagnosen		
• Abomasoenteritis	0,57	-
• Pneumonie	1,0	-
• Polyarthritits	0,21	-
• Lymphadenitis	1,0	-
• sonstige	0,26	-
Elektronenmikroskopie		
• Rotavirusnachweis	1,0	-
• Coronavirusnachweis	0,053	-
Bestand		
• Größe	-	0,067
• Betriebsform	-	0,028
Haltung Kälber		
• Gruppen-/ Einzelhaltung	-	0,55
• Einstreu	-	1,0
Bestandsprobleme	-	
• Diarrhöe	-	0,21
• Hefemastitiden	-	1,0
• Atemwegsprobleme	-	0,0029
• Anorexie	-	0,23
• Todesfälle	-	0,029
• versch. Organsysteme	-	1,0

Tab. 25: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Proben von Rindern.

Angegeben sind die in die statistische Untersuchung eingegangenen Parameter sowie die errechneten p-Werte (errechnet mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, Chi-Quadrat-Test oder zweiseitigem exaktem Test nach Fisher). P-Werte < 0,05 zeigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Detektion von Noroviren im Kot von Rindern und dem entsprechenden Parameter (grau hinterlegt). Einzelheiten siehe Text.

4.2 Detektion und Analyse von Sapoviren

4.2.1 Nachweis von Sapovirus RNS mit Hilfe der RT-PCR

4.2.1.1 Polymerasegen

Mit Hilfe der aus der Literatur stammenden Primer SR80(+)/JV33 (Vinje et al., 2000a) ließ sich von Vertretern des Genus *Sapovirus* ein 320 Basenpaare großes Fragment aus dem Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RdRp) amplifizieren (Abb. 26). Insgesamt wurden mit dieser PCR 202 Proben von Rindern, 132 Proben von Schweinen, 32 Proben von kleinen Wiederkäuern und 20 Proben von Tieren anderer Spezies untersucht. Eine Auflistung der Ergebnisse zeigt Tab. 26:

Proben	Rinder	Schweine	kleine Wiederkäuer	Tiere anderer Spezies
SaV positiv	0	7	0	0
SaV negativ	202	125	32	20
Gesamt	202	132	32	20

Tab. 26: Ergebnisse mit Hilfe der Primer JV33/SR80(+) (Vinje et al., 2000a) auf Sapovirus RNS untersuchten Proben nach Tierarten.

4.2.1.2 Kapsidgen

Eine Untersuchung der 132 Kot- und Organproben von Schweinen fand zusätzlich mit Hilfe selbst entwickelter Primer statt, welche den 5'-terminalen Bereich des Kapsidgens detektieren (Abb. 26). Diese Primer sind speziell für porcine enterale Sapoviren der Genogruppe III ausgelegt. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse dieser RT-PCR:

Proben	Schweine	davon positiv in der Sapovirus RdRp-PCR
PEC Kapsid positiv	7	6
PEC Kapsid negativ	125	1
Gesamt	132	7

Tab. 27: Proben von Schweinen, untersucht mit dem PEC-spezifischen Primerpaar PEC-02R/03F.

Für eine mit dem Primerpaar SR80(+)/JV33 positiv getesteten Probe konnte kein PCR-Fragment amplifiziert werden. Interessanterweise konnte hingegen eine Probe positiv getestet werden, für die sich mit dem Primerpaar SR80(+)/JV33 kein PCR-Fragment generieren ließ.

Zusammenfassend konnte in insgesamt acht Kotproben Sapovirus RNS detektiert werden (sieben Proben in der RdRp RT-PCR, sieben Proben in der Kapsid RT-PCR, sechs Proben in beiden Testverfahren). Dies entspricht einer Prävalenz von 6,1%.

Eine Auflistung der positiv getesteten Schweine zeigt Tab. 28. Die acht Schweine, in deren Kot Sapovirus RNS detektiert werden konnte, stammten aus vier unterschiedlichen Betrieben in Hessen, Baden-Württemberg, Bayern sowie den Niederlanden. Die betroffenen Tiere waren zwei bis vier Wochen alt; in drei Fällen war kein Alter angegeben. Drei Tiere litten zum Zeitpunkt der Probennahme an Diarrhöe, zwei Tiere hatten andere gesundheitliche Probleme, drei Tiere waren gesund. Zwei der fünf Betriebe hatten ein Diarrhöe-Bestandsproblem.

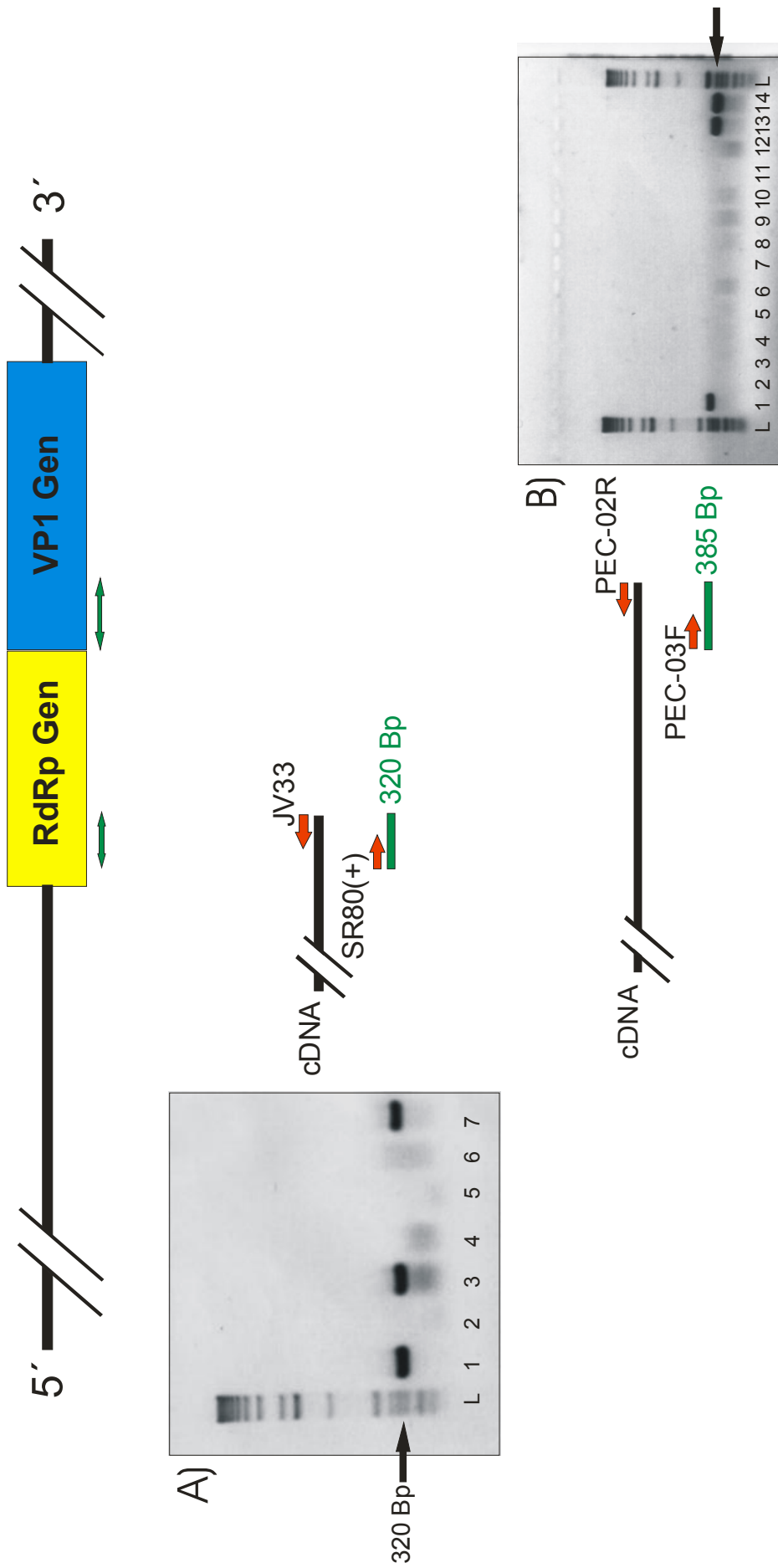


Abb. 26: RT-PCR zum Nachweis von Sapovirus RNS. Lokalisation der Primerpaare JV33/SR80(+) sowie Pec-02R/03F im Sapovirus Genom.

A) Primerpaar SR80(+)/JV33 (320 Bp der RNS-abhängigen RNS-Polymerase). Spur 1: Positivkontrolle (Aqua ddPCR, mit den Proben aufgearbeitet), Spur 5: Kontaminationskontrolle, Spuren 3, 7: positive Proben, Spuren 4, 6: negative Proben. B) Primerpaar PEC-02R/03F (385 Bp des VP1). Spur 1: Positivkontrolle, Spur 2: Negativkontrolle (Aqua ddPCR, mit den Proben aufgearbeitet), Spuren 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11: Negative Proben, Spuren 4, 7, 11: Negative Proben aufgearbeitet, Spuren 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12: negative Proben, Spuren 13 und 14: positive Proben. L: 1 Kb-Größenmarker. 1,5%-ige Agarosegele.

Die grünen Pfeile geben die Lokalisationen der Amplifikate im jeweiligen Gen an.

ID	Alter	Herkunft Ort/ Bundesland	Bestand Nr.	Bestands- probleme	Symptome	Material	EM- Ergebnis	Isolatname
KP004Schw. 158/03 S ¹	2 Wo	Giessen/ Giessen/HES	25	Diarrhöe	Diarrhöe	Kot	n.d.	Po/SaV/GGIII/ Giessen-06A und 06B/2003/DE
KP020Schw. My11 ²	-	Hofstetten/Ortenaukreis B-W	54	keine	gesund	Kot	n.d.	Po/SaV/GGIII/ Giessen- 08/2003/DE
KP044Schw. IV4739/ 01.10.03 ¹	-	Echtenerbrug/ Niederlande	60	keine	gesund	Kot	Sapo	Po/SaV/GGIII/ Giessen- 03/2003/NL
KP047Schw. IV2294/ 01.10.03 ¹	-	Echtenerbrug/ Niederlande	60	keine	Diarrhöe	Kot	negativ	Po/SaV/GGIII/ Giessen- 01/2003/NL
KP070Schw. 25/04 ¹	3 Wo	München/kreisfreie Stadt/B	66	Diarrhöe	Diarrhöe	Kot	negativ	Po/SaV/GGIII/ Giessen- 02/2004/DE
KP071Schw. 57/04 ¹	3 Wo	München/kreisfreie Stadt/B	66	Diarrhöe	Nabelabszess	Kot	n.d.	Po/SaV/GGIII/ Giessen-07A und 07B/2004/DE
KP072Schw. 53/1/04 ¹	6 Wo	München/kreisfreie Stadt/B	66	Diarrhöe	Pneumonie	Kot	n.d.	Po/SaV/GGIII/ Giessen 04/2004/DE
KP128Schw. Mo 12 ³	3-4 Wo	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis/HES	67	keine	gesund	Kot	n.d.	Po/SaV/GGIII/ Giessen- 05/2005/DE

Tab. 28: Auflistung der in der Sapovirus RT-PCR (Primer SR80(+)/JV33 und/oder PEC-03F/02R) positiven Proben von Schweinen.

- = keine Angabe vorhanden, n.d. = nicht durchgeführt. HES = Hessen, B-W = Baden-Württemberg, B = Bayern.

¹ sowohl in der RT-PCR RdRp als auch in der RT-PCR VP1 positiv

² nur in der RT-PCR VP1 positiv

³ nur in der RT-PCR RdRp positiv

4.2.2 Phylogenetische Analysen

4.2.2.1 Ermittlung von Nukleinsäureteilsequenzen

Die PCR-Produkte aus dem 3'-Bereich der für die RNS-abhängigen Polymerase und aus dem 5'-Bereich der für das Kapsid kodierenden Region des sapoviralen Genoms wurden analog zu denen der Norovirus-Isolate prozessiert. Dazu wurden die erhaltenen PCR-Produkte in den bakteriellen Plasmidvektor pCR 2.1 TOPO® (Fa. Invitrogen) ligiert, kloniert und anschließend sequenziert. Die Konsensussequenz von drei unabhängigen Klonen wurde zur phylogenetischen Analyse eingesetzt. Von den Isolaten, die nicht in die für porcine Sapoviren typische Genogruppe III des Genus *Sapovirus* eingeordnet werden konnten (Abb. 27), wurden unabhängige Ansätze (beginnend bei der Extraktion der Nukleinsäure aus dem Originalmaterial) durchgeführt, um die Ergebnisse zu bestätigen. Zusätzlich wurde die aus einer humanen Stuhlprobe stammende Positivkontrolle (PK14) sequenziert, die dem Isolat Sapovirus Hu/Dresden/pJP-Sap01/DE („Dresden“) (Genbank-Zugangsnummer AY694184) entspricht (Daten nicht gezeigt). Tab. 29 fasst die Genbank-Zugangsnummern der in Giessen ermittelten Sapovirus-Sequenzen (RNS-abhängige RNS-Polymerase (RdRp), Kapsid (VP1)) zusammen:

Name	Proben ID	Jahr der Isolierung	Spezies	Herkunft	Genbank-Zugangsnummer	
					RdRp	VP1
Po/SaV/GGI/III/ Giessen-01/2003/NL	KP047 Schw.	2003	Schwein	Niederlande	EU122236	EU122237
Po/SaV/GGI/III/ Giessen-02/2004/DE	KP070 Schw.	2004	Schwein	Bayern	EU122240	EU122241
Po/SaV/GGI/III/ Giessen-03/2003/NL	KP044 Schw.	2003	Schwein	Niederlande	EU122238	EU122239
Po/SaV/GGI/III/ Giessen-04/2004/DE	KP072 Schw.	2004	Schwein	Bayern	EU122242	EU122243
Po/SaV/GGI/III/ Giessen-05/2005/DE	KP128 Schw.	2005	Schwein	Hessen	EU122247	-
Po/SaV/GGI/III/ Giessen-06A und 06B/2003/DE	KP004 Schw.	2003	Schwein	Hessen	A: EU122233 B: EU122234	EU122235
Po/SaV/GGI/III/ Giessen-07A und 07B/2004/DE	KP071 Schw.	2004	Schwein	Bayern	A: EU122244 B: EU122245	EU122246
Po/SaV/GGI/III/ Giessen-08/2003/DE	KP020 Schw.	2003	Schwein	Baden-Württemberg	-	EU122248

Tab. 29: Genbank-Zugangsnummern Sapovirusisolate.

Genbank-Zugangsnummern der in Giessen ermittelten Sequenzen von Sapoviren (RdRp und VP1) von Schweinen der in Giessen ermittelten Sequenzen. Nomenklatur nach Green: Spezies, aus der das Virus isoliert wurde/Genus/Spezies (oder Genogruppe)/Isolatname/Jahr der Isolierung/Herkunftsland (Green, 2007).

4.2.2.2 Phylogenetische Analysen im Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RdRp)

Abb. 27 zeigt einen phylogenetischen Baum des Genus *Sapovirus*, der die in Giessen determinierten Sequenzen enthält. Dazu wurde ein 228 Basen großes Fragment aus dem 5'-terminalen Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase analysiert.

Die in Giessen gefundenen Sequenzen gruppieren zusammen mit den bekannten porcinen Sequenzen der Genogruppe III sowie einer möglichen neuen Genogruppe VI der Sapoviren. Die Isolate Giessen-01 bis Giessen-05 ordnen sich zusammen mit den Vertretern der Genogruppe III ein, wohingegen die Isolate Giessen-06 und Giessen-07 zusammen mit Vertretern einer kürzlich in den USA detektierten neuen Genogruppe, Genogruppe VI, gruppiert werden (Wang et al., 2005a). Diese sind im phylogenetischen Baum als Giessen-06A und 07A (*) gekennzeichnet. Die der Genbank entnommenen porcinen Isolate PECNL und MIQW19 können in keine der bisher bekannten Genogruppen eingeordnet werden und bilden vermutlich ein neues weiteres Cluster porciner Sapoviren.

4.2.2.3 Phylogenetische Analysen im Bereich des Kapsidgens (VP1)

Zusätzlich wurden 351 Basen des 3'-terminalen Bereichs der für das Kapsidprotein VP1 kodierenden Region analysiert. Die Isolate bilden gemeinsam mit anderen porcinen Vertretern ein eigenes Cluster in Genogruppe III der Sapoviren, darunter interessanterweise auch die Isolate Giessen-06 und Giessen-07 (Abb. 28), welche für den Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase in die neue Genogruppe VI eingordnet werden können (Abb. 27).

4.2.2.4 Phylogenetische Analysen im Bereich des RdRp-VP1 Übergangsbereiches

Um zu ermitteln, ob es sich bei den Isolaten Giessen-06 und Giessen-07 um rekombinante Viren handelt, wurde mit den Primern SR80(+) und PEC-02R der Übergangsbereich zwischen Polymerase und Kapsid mit Hilfe des One Step RT-PCR Kits® amplifiziert. Dabei ergab sich in beiden Fällen eine den Isolaten der Genogruppe III ähnliche Sequenz. Die korrespondierenden RdRp-Sequenzen sind im Baum als Giessen-06B und 07B gekennzeichnet (*) (Abb. 27).

Eine Amplifikation des Übergangsbereiches zwischen Polymerase und Kapsid der Isolate Giessen-06 und Giessen-07 mit Hilfe Genogruppe VI-spezifischer Primer war bislang trotz zahlreicher Versuche nicht erfolgreich.

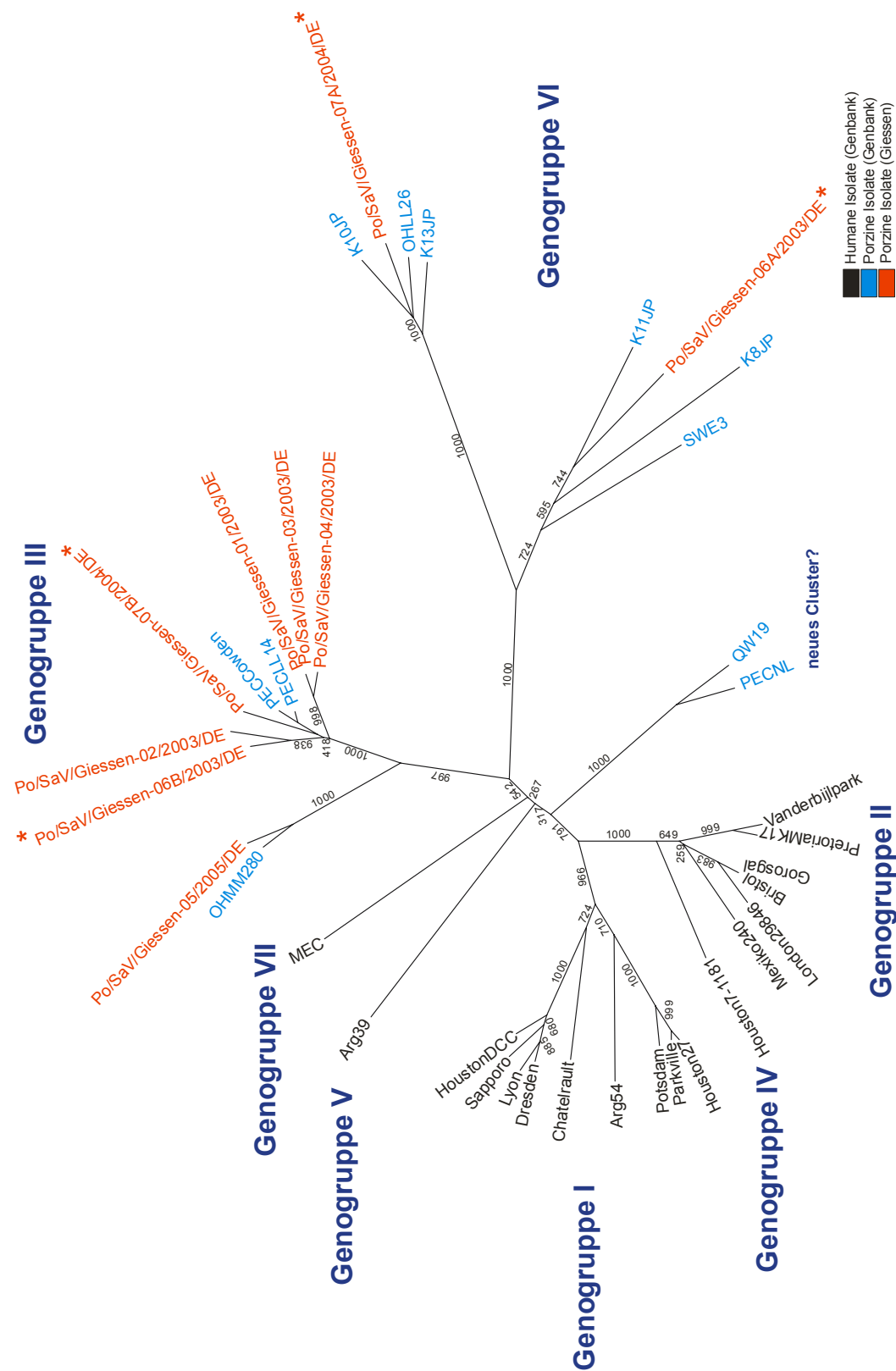


Abb. 27: Phylogenetischer Baum von Vertretern des Genus *Sapovirus* auf der Basis von 228 Basen der RdRp. Die in Giessen bestimmten Sequenzen sind in roten Lettern markiert. Die phylogenetischen Distanzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet; der Baum wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Zur statistischen Absicherung wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1.000 Replikaten durchgeführt; die Zahlen geben Bootstrap-Werte an. Die Astlängen sind proportional zur genetischen Distanz. * = Isolate aus Kotproben, in denen Sequenzen zweier verschiedener porciner enteraler Sapoviren isoliert werden konnten.

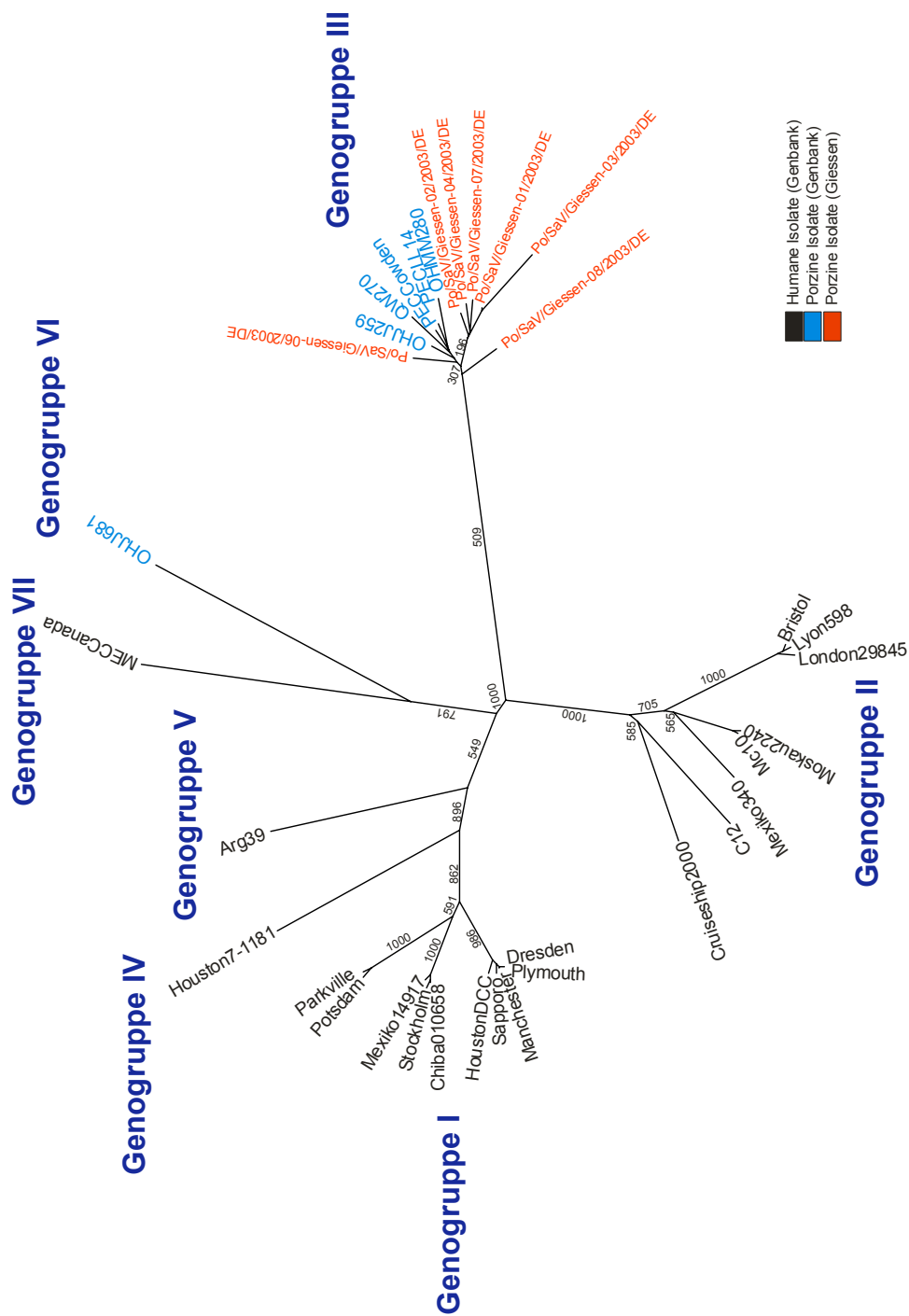


Abb. 28: Phylogenetischer Baum von Vertretern des Genus Sappovirus auf der Basis von 351 Basen des Kapsidgens.
Die in Giessen bestimmten Sequenzen sind in roten Lettern markiert. Die phylogenetischen Distanzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet; der Baum wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Zur statistischen Absicherung wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1.000 Replikaten durchgeführt; die Zahlen geben Bootstrap-Werte an. Die Astlängen sind proportional zur genetischen Distanz.

4.2.2.5 Häufigkeitsverteilungen der Distanzen von Sapoviren in Teilbereichen der für die RNS-abhängige RNS-Polymerase und der für das Kapsid kodierenden Genombereiche

Abb. 29 zeigt die Häufigkeitsverteilungen und Einteilung der Distanzen der Sapovirus-Sequenzen, die für die Erstellung der phylogenetischen Bäume (Abb. 27 und Abb. 28) verwendet wurden. Die Distanzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet. Die erhaltenen Werte wurden zunächst in Klassen (5 – 65) eingeteilt. Mit Hilfe des Programmes Excel (Fa. Microsoft) wurde die Häufigkeitsverteilung ermittelt und graphisch dargestellt.

Eine eindeutige Einteilung konnte analog zu der Untersuchung bei Noroviren (Kapitel 4.1.2.4) nur für den Bereich des Kapsidgens gezeigt werden (Abb. 29 B). Hier lagen die Distanzen innerhalb der Genogruppen bei 0 bis 30,48 Austauschen pro 100 Basen, zwischen den Genogruppen hingegen bei 33,62 bis 57,26 Austauschen pro 100 Basen und ergaben somit eine klare Trennung zwischen beiden Kategorien. Das Verteilungsmuster der Häufigkeiten zeigte zwei deutliche Maxima innerhalb dieser Gruppen.

Für den untersuchten Bereich des für die RNS-abhängige RNS-Polymerase kodierenden Genomabschnittes (Abb. 29 A) ergaben sich sehr hohe Distanzen von bis zu 47,37 innerhalb der Genogruppen. Dies resultierte vor allem durch Einschluss der heterogenen Genogruppe VI. Daher wurde eine weitere Berechnung unter Teilung der Genogruppe VI in zwei getrennte Genogruppen durchgeführt. Die größte Distanz innerhalb der Genogruppen lag nunmehr bei 34,65. Die Distanzen zwischen den Genogruppen bewegten sich zwischen 30,26 und 58,77. Eine klare Einteilung anhand der Distanzwerte ist allerdings nicht möglich, da keine klare Trennung zwischen den Kategorien ermittelt werden konnte.

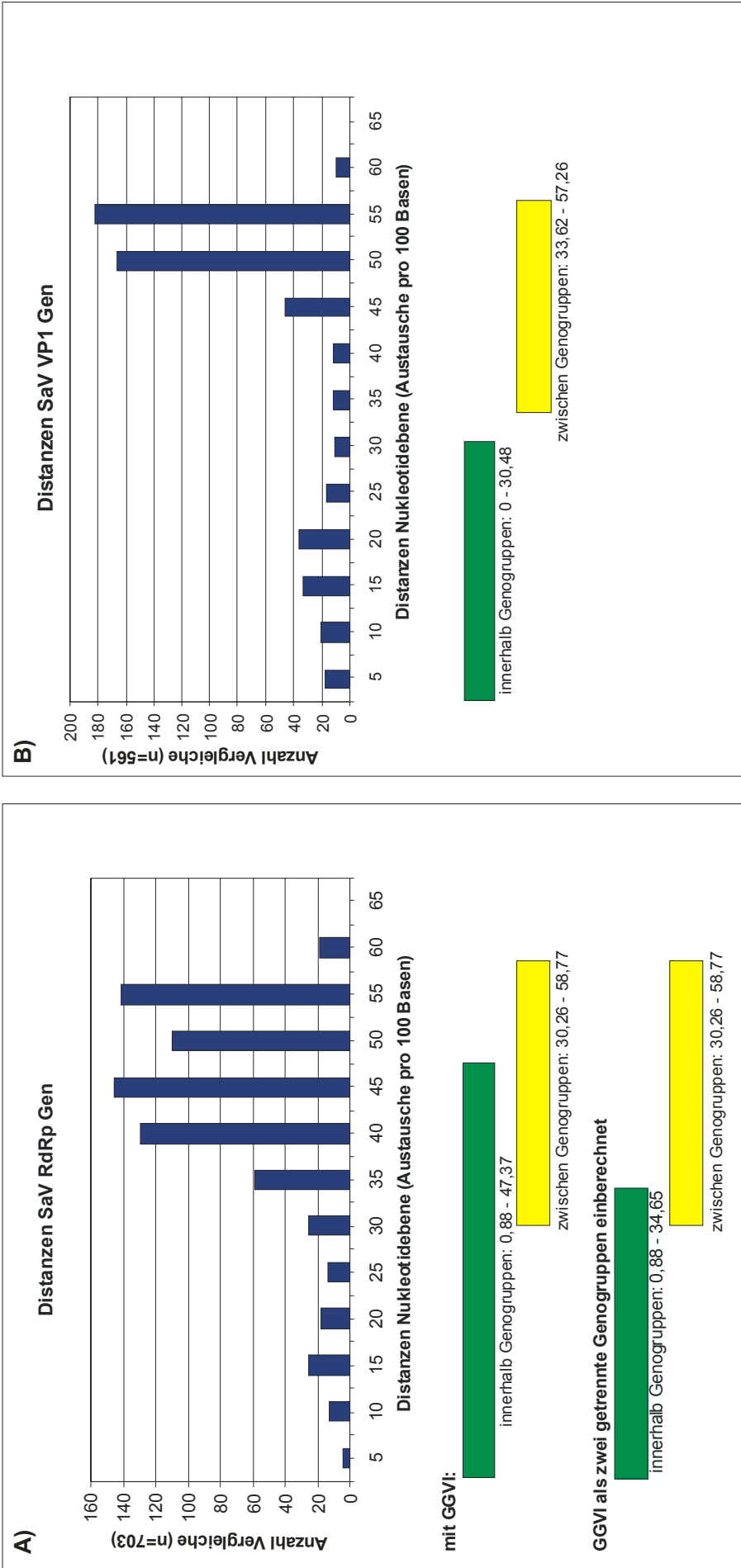


Abb. 29: Häufigkeitsverteilungen der Divergenzen von Sapovirus-Sequenzen.
A) Häufigkeitsverteilung von 38 Sequenzen eines 228 B großen Fragmentes aus dem Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase und B) 34 Sequenzen eines 351 B großen Fragmentes aus dem Bereich des Kapsidgens, die für die Erstellung der phylogenetischen Bäume (Abb. 27 und Abb. 28) verwendet wurden. Die paarweisen genetischen Distanzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet und die Häufigkeitsverteilungen graphisch dargestellt. Klassenenteilung 5 bis 65. Die innerhalb und zwischen den Genogruppen vorhandenen Distanzen (Minima bis Maxima) sind durch farblich markierte Balken dargestellt. Grün: Distanzen innerhalb der Genogruppen, gelb: Distanzen zwischen den Genogruppen.

4.2.2.6 Analyse nicht sapoviraler Sequenzen

Auch in der Sapovirus RT-PCR (Primerpaare SR80+/JV33 sowie PEC-02F/03R) konnten PCR-Fragmente der scheinbar richtigen Größe generiert werden, die nach Sequenzierung jedoch keine Ähnlichkeiten mit anderen Sapovirussequenzen zeigten. Diese wurden mit dem BLAST weiterbearbeitet. Eine Auflistung dieser Amplifikate zeigt Tab. 30.

Proben ID	Spezies	Primerpaar	Größe PCR-Fragment	BLAST-Ergebnis/ % NS-Identität
KP021Schw., KP041Schw., KP042Schw., KP043Schw.	Schwein	PEC-03F/02R	330 Bp	Clostridium rectum 16S rRNS Gen (304/309: 98%)
KP050Schw.	Schwein	PEC-03F/02R	254 Bp	Rhizobium sp. HPC 876 16S ribosomale RNs (245/254: 96%)
KP054Schw.	Schwein	SR80/JV33	305 Bp	Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria (129/232: 55%)
KP201Rd.	Rind	SR80/JV33	333 Bp	Bovines Rotavirus (270/316: 85%)
KPKatze 18243	Katze	SR80/JV33	320 Bp	Felines Calicivirus Stamm F14 (230/282: 81%)
KPZiege 4877	Ziege	SR80/JV33	321 Bp	Cercopithecines Herpesvirus 1 (49/76: 64%)
KP066Schw.	Schwein	SR80/JV33	330 Bp	Chlamydia muridarum (153/182: 84%)
KP064Schw.	Schwein	PEC-03F/02R	386 Bp	Clostridium rectum 16S rRNS Gen (304/309: 98%)
KP501Rd.	Rind	SR80/JV33	321 Bp	Sequenz 45 von Patent WO0127158 (Olfaktorischer Rezeptor Sequenzen) (211/211: 100%)

Tab. 30: Auflistung der in der RT-PCR (Primerpaare SR80(+)/JV33, PEC-03F/02R) falsch positiven Proben. Die Identität auf Nukleotidebene ist angegeben in %. Beispiel: 304/309: 98% = 304 Nukleotide von 309 sind identisch (98%). Amplifikate, für die BLAST virale Sequenzen aufzeigte, sind grau hinterlegt.

In den meisten Proben wurden unspezifische Nukleinsäuren gefunden, in einigen Proben jedoch auch Krankheitserreger wie z.B. Clostridien (KP064Schw., KP021Schw., KP041-043Schw.) und Chlamydien (KP066Schw.). Interessant ist, dass auch Rinder-assoziierte Viren nachgewiesen wurden. Dazu gehört die Detektion von bovinem Rotavirus (Probe KP201Rd.) mit dem Primerpaar SR80+/JV33. Auch felines Calicivirus konnte in der Probe einer Katze (Darmmaterial) mit dem Primerpaar detektiert werden (Probe KPKatze18243). Die Detektion falsch positiver Proben, in diesem Falle nicht sapoviraler Sequenzen, ist ein Anzeichen für die geringe Spezifität und die dadurch bedingten falsch-positiven Ergebnisse.

Die Notwendigkeit der Sequenzierung positiver Proben zum Beweis tatsächlich-positiver Proben zeigt ähnlich wie bei der Norovirus RT-PCR (RdRp), dass diese PCR für den Nachweis in der Routine-Diagnostik ohne nachfolgende Verifikation nicht geeignet ist (Diskussion Kapitel 5.1).

4.2.3 Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Sapoviren

Ebenso wie bei Noroviren gelang auch bei den Sapoviren der erste Nachweis aus Kotproben durch die Elektronenmikroskopie (Madeley und Cosgrove, 1975). Mit Hilfe eines Kaninchenantiseraums gegen bakteriell exprimiertes humanes Sapovirus-Kapsidprotein wurde eine zuvor in der RT-PCR positiv getestete Probe immunelektronenmikroskopisch auf Sapoviruspartikel untersucht; dabei konnten Sapoviruspartikel detektiert werden. Klar erkennbar sind die kelchartigen Vertiefungen auf der Oberfläche der Virionen (Abb. 30), die wesentlich deutlicher ausgeprägt sind als bei den Noroviruspartikeln (Abb. 16). Dennoch ist der elektronenmikroskopische Nachweis aufgrund der vergleichsweise geringen Sensitivität nicht die Methode der Wahl, um Sapoviren in Kotproben zu detektieren.

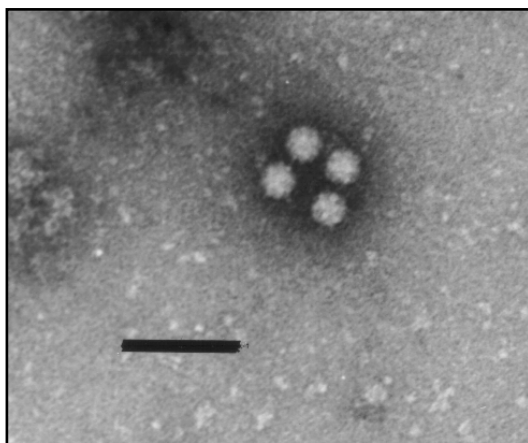


Abb. 30: Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Sapoviruspartikeln in einer Kotprobe eines infizierten Schweines.

Detektiert in der Kotprobe eines mit Sapoviren infizierten Schweines (KP044Schw., zuvor positiver Sapovirus-Nachweis mittels RT-PCR). Negativkontrastierung mit 2% Methylaminowolframat. Erkennbar sind die kelchartigen Vertiefungen auf der Oberfläche der Virionen. Balken: 100 nm.

4.2.4 Statistische Auswertung

4.2.4.1 Fragebogenaktion Schwein

Die Einträge der bei der Probenentnahme ausgefüllten Fragebögen wurden analog der statistischen Auswertung bei den Noroviren auf Zusammenhänge im Hinblick auf das Vorhandensein einer Sapovirusinfektion untersucht. Die Proben von Schweinen mussten dazu nicht weiter unterteilt werden, da hier nur sieben Einsendungen vorlagen und die restlichen 125 Proben im Rahmen der Fragebogenaktion gesammelt wurden.

Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 0,05$ angesetzt; das heißt Werte, die $\leq 0,05$ lagen, zeigten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Sapoviren und dem entsprechenden Parameter. Die Rohdaten, die der statistischen Auswertung zu Grunde lagen, sind im Anhang tabellarisch aufgelistet.

In acht der 132 von Schweinen gesammelten Proben (6,1%) konnte mit Hilfe der RT-PCR Sapovirus-RNS detektiert werden. Die Tiere stammten aus fünf Bundesländern (Hessen, Rheinland-Pfalz, Sachsen-Anhalt, Bayern, Baden-Württemberg) und aus den Niederlanden.

4.2.4.1.1 Jahreszeitliche Verteilung

Abb. 31 gibt eine Übersicht über die jahreszeitliche Verteilung der Proben. Der mit Hilfe des exakten Testes nach Fisher ermittelte p-Wert ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Sapoviren und einer bestimmten Jahreszeit ($p = 0,57$).

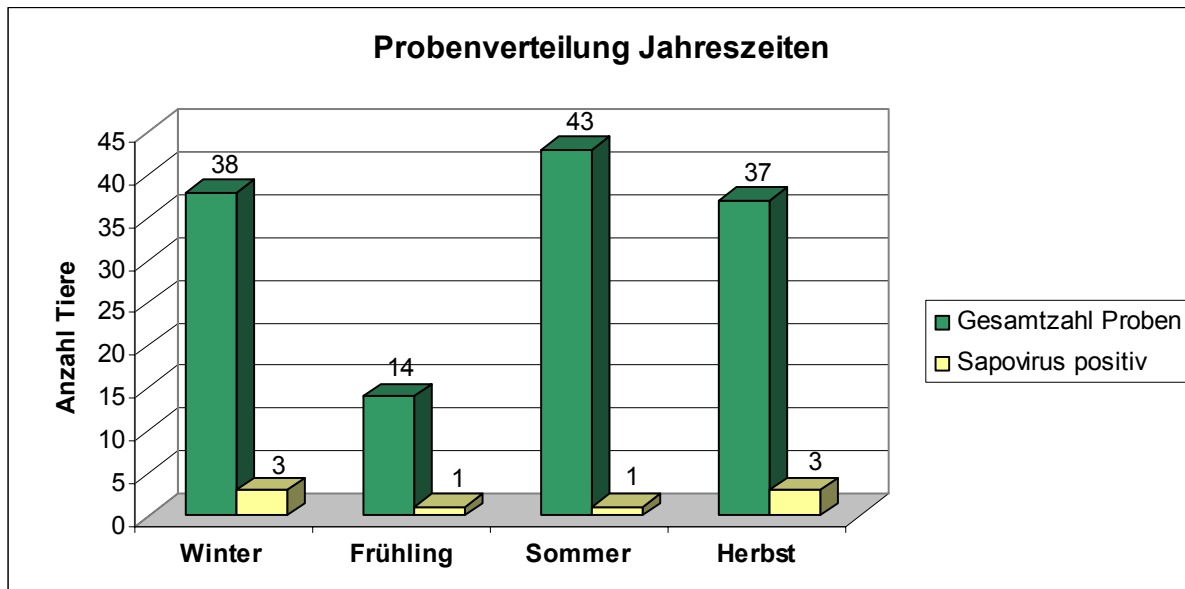


Abb. 31: Probenverteilung der eingesandten Proben von Schweinen nach Jahreszeiten sowie positivem Sapovirusgenomnachweis.

Alter: Eine Altersangabe lag in 74 Fällen vor, darunter von fünf positiven Tieren. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergab einen statistisch signifikanten Wert von 0,047; d.h. die Sapovirus positiven Tiere waren signifikant jünger als die Tiere, in deren Kotproben keine Sapovirus-RNS nachgewiesen wurde. Die nachfolgende Grafik zeigt die Altersverteilung mit Hilfe eines Box-and-Whisker-Plots.

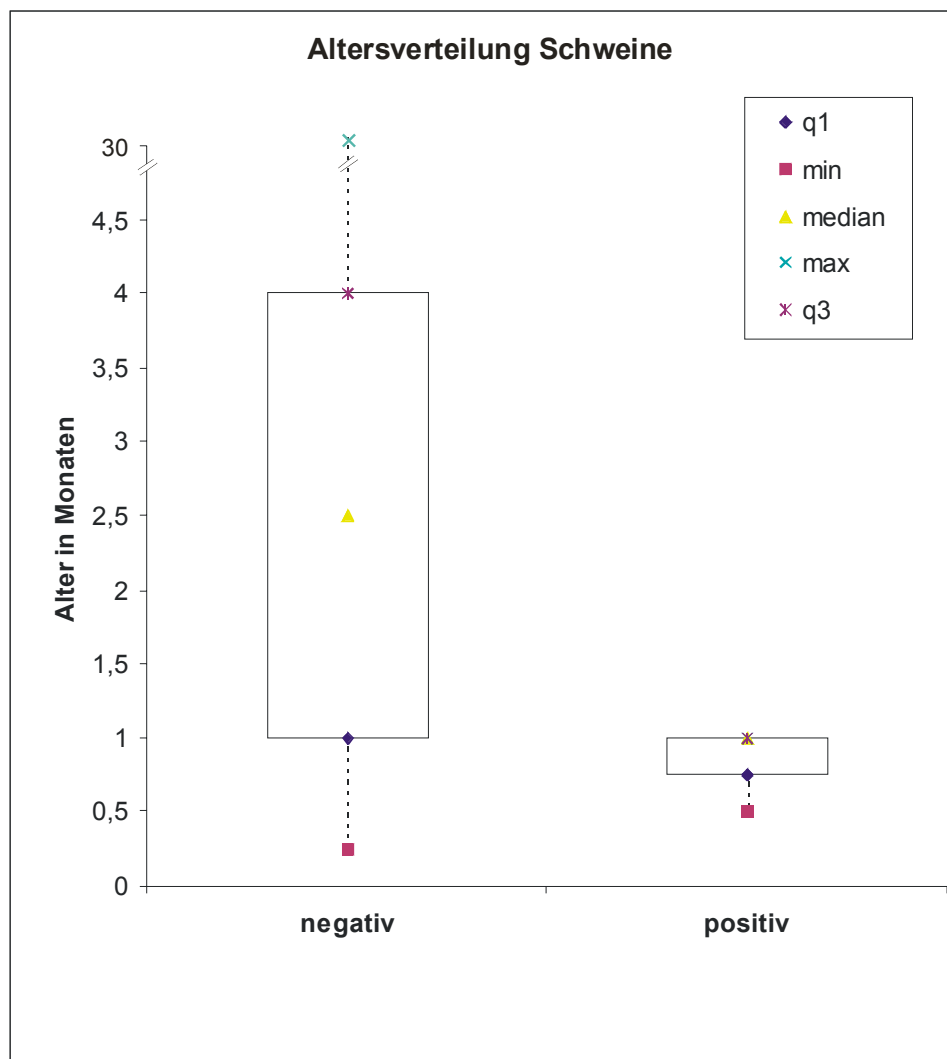


Abb. 32: Altersverteilung der Proben von Schweinen.

Darstellung im Box-and-Whisker-Plot. q1 = 1. Quartil, q3 = 3. Quartil, min = kleinster Wert, max = größter Wert.

Rasse/Geschlecht: Die Rasse der Tiere war in 88 Fällen angegeben. Der p-Wert zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zum Vorliegen einer Sapovirusinfektion ($p = 0,15$), ebenso wie der p-Wert für das Geschlecht, das in 70 Fällen angegeben war ($p = 1,0$).

Herkunft: 53 der untersuchten Tiere stammten aus Hessen, 55 aus Baden-Württemberg bzw. Bayern und die übrigen Tiere aus Rheinland-Pfalz und Sachsen-Anhalt. Der mit dem exakten Test nach Fisher errechnete p-Wert lag bei 0,55 (nicht signifikant). Die Proben aus den Niederlanden wurden nicht einbezogen.

4.2.4.1.2 Betriebsform/Bestandsprobleme

Betriebsform: 50 Tiere, die aus Kliniken stammten, sowie vier Tiere aus Versuchsbetrieben mussten von dieser statistischen Untersuchung ausgeschlossen werden. Die verschiedenen Betriebsformen wurden in Mastbetriebe und Betriebe mit Aufzucht und Mast unterteilt. Der p-Wert lag bei 1,0 (nicht signifikanter Zusammenhang zum Vorliegen einer Sapovirusinfektion).

Bestandsgröße: In 76 Fällen war die Bestandsgröße angegeben. Diese lag zwischen zwei und 2200 Tieren. Der mit dem exakten Wilcoxon-Mann-Whitney Test errechnete p-Wert lag bei 0,13, d.h. es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Bestandsgröße und dem Vorliegen einer Sapovirusinfektion detektiert werden.

Bestandsprobleme: 75 Tiere stammten aus Betrieben, in denen zum Zeitpunkt der Probenentnahme Diarrhöe vorkam. Von vier Tieren gab es dazu keine Angaben. Der Chi-Quadrat-Test ermittelte hier einen p-Wert von 0,61 (nicht signifikant).

4.2.4.1.3 Symptome Einzeltier

Diarrhöe: 31 Tiere litten zum Zeitpunkt der Probenentnahme an Diarrhöe. Für zwei Tiere gab es hierzu keine Angabe. Der p-Wert lag bei 0,35 (nicht signifikant).

Weitere Symptome: Weitere Symptome der Einzeltiere sind in Abb. 33 zu sehen. Außer für die Symptomgruppe Haut und Hautanhangsorgane ($p = 0,019$) gab es keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zum Vorliegen einer Sapovirusinfektion.

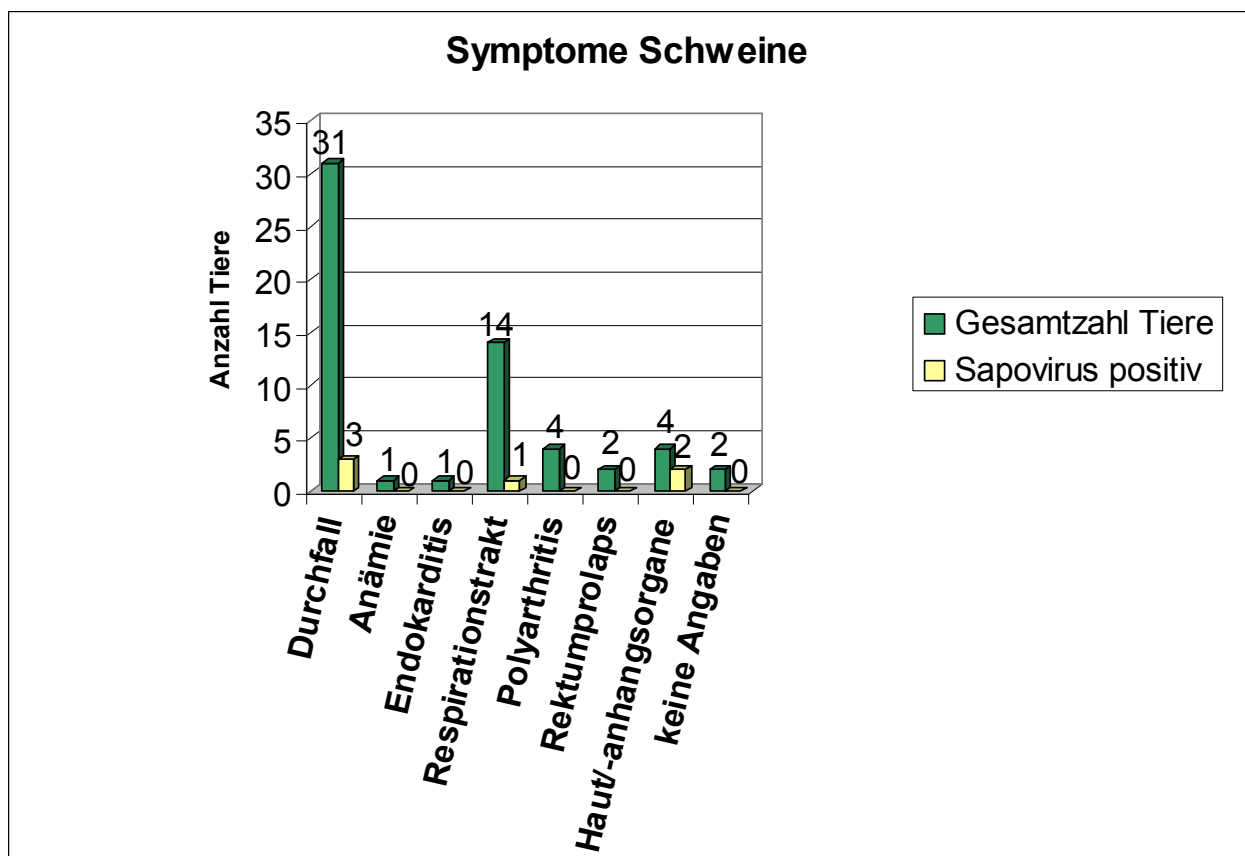


Abb. 33: Symptome der Einzeltiere (Schweine).

Mehrfachnennungen waren möglich. 99 Tiere zeigten zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine klinischen Symptome, darunter drei Sapovirus positive Tiere.

4.2.4.2 Zusammenfassung der statistischen Untersuchung

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der statistischen Untersuchung zusammen. Statistisch signifikante Parameter im Zusammenhang mit dem positiven Nachweis von Sapoviren in Kotproben von Schweinen sind grau hinterlegt.

Parameter	p-Wert
Jahreszeit	0,57
Alter	0,047
Rasse	0,15
Geschlecht	1,0
Herkunft	0,55
Symptome Einzeltier/ betroffene Organsysteme	
• Diarrhöe	0,35
• Respirationstrakt	1,0
• Magen-Darm-Trakt	1,0
• ZNS/ Bewegungsapparat	1,0
• Haut/-anhangsorgane	0,019
• Anämie	1,0
• Endokarditis	1,0
Bestand	
• Größe	0,13
• Betriebsform	1,0
Bestandsprobleme	
• Diarrhöe	0,61

Tab. 31: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Fragebogenaktion Schwein.

Angegeben sind die in die statistische Untersuchung eingegangenen Parameter sowie die errechneten p-Werte (errechnet mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, Chi-Quadrat-Test oder zweiseitigem exakten Test nach Fisher). P-Werte < 0,05 zeigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Detektion von Sapoviren im Kot von Schweinen und dem entsprechenden Parameter (grau hinterlegt).

4.3 Produktion von virusähnlichen Partikeln (VLPs)

Das Kapsidprotein VP1 von Caliciviren einschließlich Noro- und Sapoviren hat die Eigenschaft, nach Expression in heterologen Systemen selbständig zu virusähnlichen Partikeln, sogenannten VLPs zu aggregieren. VLPs bilden die Grundlage für diagnostische Testverfahren. Da die VLPs morphologisch und antigenetisch den authentischen Virionen sehr ähnlich sind, können sie u.a. für die folgenden Zwecke eingesetzt werden:

- als Antigen zur Immunisierung von Versuchstieren, die zur Gewinnung von polyklonalen Seren oder monoklonalen Antikörpern dienen,
- als Antigen im Testsystem (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern
- sowie für strukturelle Untersuchungen an Virionen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten sowohl bovine Norovirus-VLPs als auch porcine Sapovirus-VLPs produziert werden, die anschließend für diagnostische Tests sowie zur Gewinnung von Antikörpern zur Verfügung stehen.

Die Produktion der VLPs wurde mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems durchgeführt. Baculoviren wurden bereits im 16. Jahrhundert als „Welkkrankheit“ bei Seidenraupen beschrieben und später als Biopestizide zur Bekämpfung von Schadinsekten eingesetzt. Sie werden seit Anfang der 1990er Jahre zur Produktion von Eukaryonten-Proteinen verwendet, u.a. da sie einfach in Zellkultur vermehrt werden können.

4.3.1 Expression des Strukturproteins VP1 des porzinen enteralen Sapovirus (Stamm PEC Cowden)

Rekombinante Baculoviren, die das Kapsidprotein (VP1) des porzinen enteralen Sapovirus (PEC Stamm Cowden) exprimieren (rPEC), wurden von Prof. Linda Saif, Food Animal Health Research Program, Department of Veterinary Preventive Medicine, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University, Wooster, USA zur Verfügung gestellt.

4.3.1.1 Produktion von VLPs

Die erhaltenen Baculoviren (rPEC) wurden verwendet, um SF21-Zellen (*Spodoptera frugiperda*) zu infizieren und so einen Virusstock herzustellen. Der Kulturüberstand wurde bei vollständiger Lyse der Mehrzahl der Zellen (etwa sieben Tage p.i.) (Abb. 34 B und C) geerntet. Zur Bestimmung des Virustiters wurde ein Plaquetest durchgeführt. Nach sieben bis zehn Tagen ließ sich der Titer durch Auszählung der Plaques ablesen und konnte nach mehreren Passagen bis auf $2,9 \times 10^7$ pfu/ml erhöht werden.

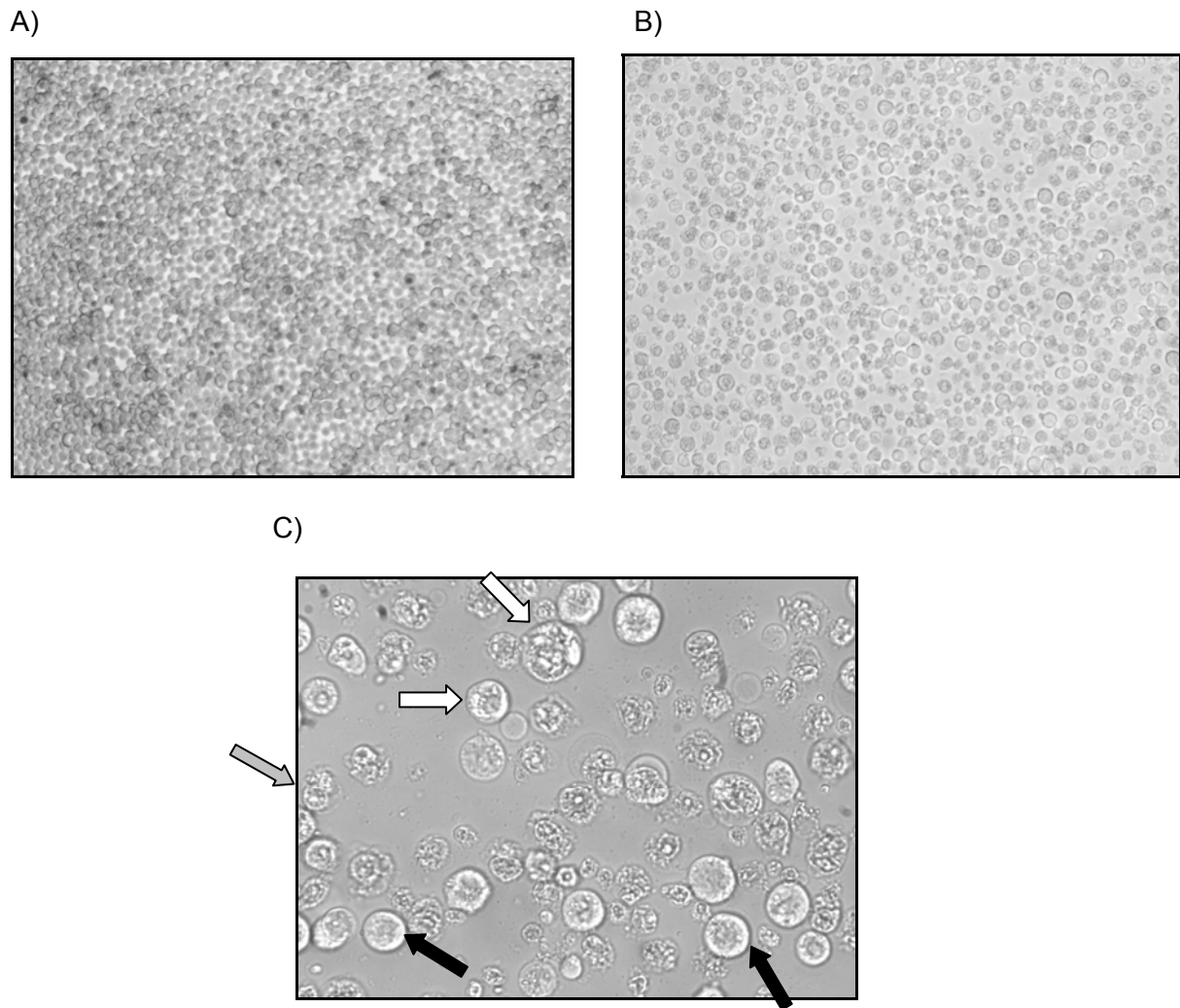


Abb. 34: Mikroskopisches Bild von SF-21 Zellen.

A) Intakter Zellrasen (Vergrößerung 1:100). B) Zellrasen nach Infektion mit rekombinantem Baculovirus (rPEC) (Vergrößerung 1:100). C) Detailaufnahme des zytopathischen Effektes (Vergrößerung 1:400). Sichtbar sind späte Anzeichen (granuläres Aussehen der infizierten Zellen (weiße Pfeile)) sowie sehr späte Anzeichen (Lysis) (grauer Pfeil) der Infektion. Einige Zellen sind noch intakt (schwarze Pfeile).

4.3.1.2 Nachweis der Expression des VP1

Mit rPEC infizierte SF21-Zellen wurden drei Tage nach Infektion mit 2% Paraformaldehyd fixiert, mit Octylglykosid permeabilisiert und anschließend über eine indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Ein im Kaninchen hergestelltes Antiserum gegen bakteriell exprimiertes humanes Sapovirus Kapsidprotein (erhalten von J. Rohayem, Universität Dresden) wurde als erster Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Ein Cy3-markierter Ziege- α -Kaninchen Antikörper (1:500 verdünnt) wurde als zweiter Antikörper verwendet. Das Vorkommen von PEC Kapsidprotein konnte anhand fluoreszierender Granula im Zytoplasma von etwa 40% der Zellen nachgewiesen werden, wie Abb. 35 zeigt. Das Fluoreszenzsignal zeigte dabei eine sehr starke Ausprägung.

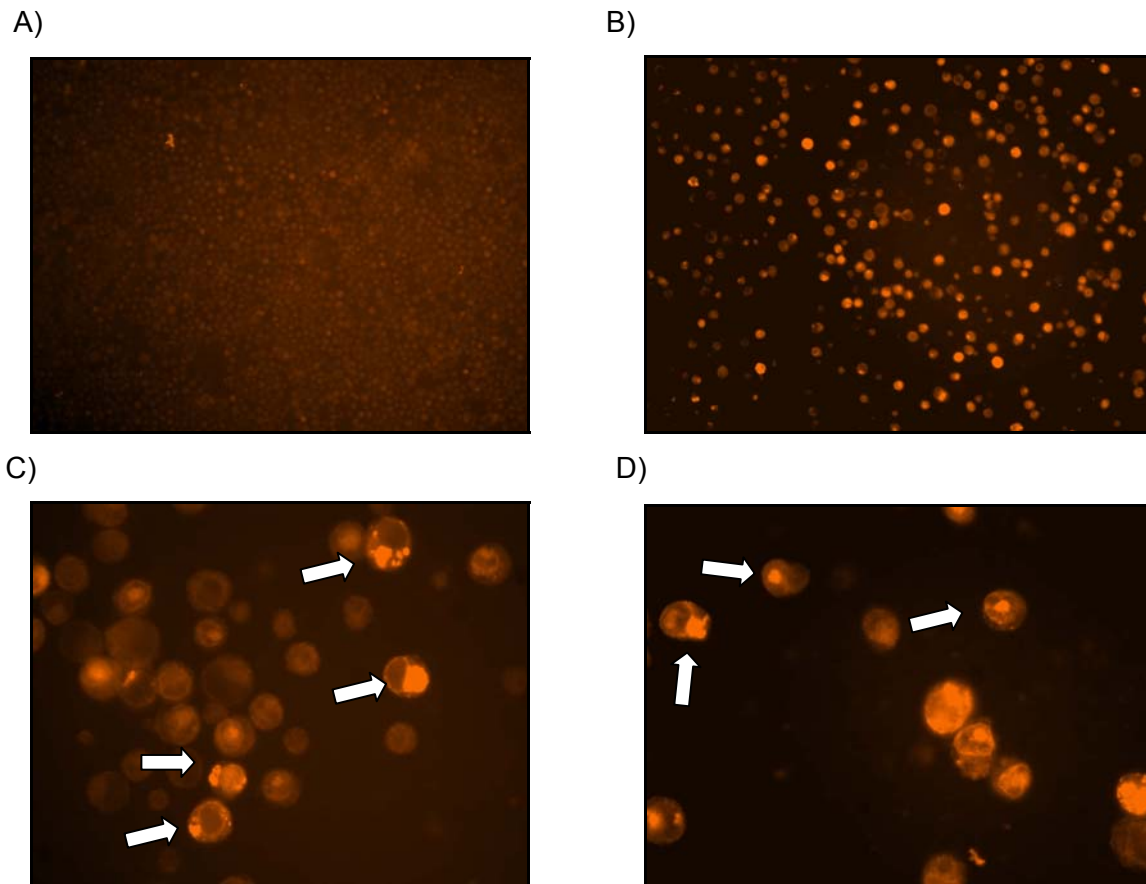


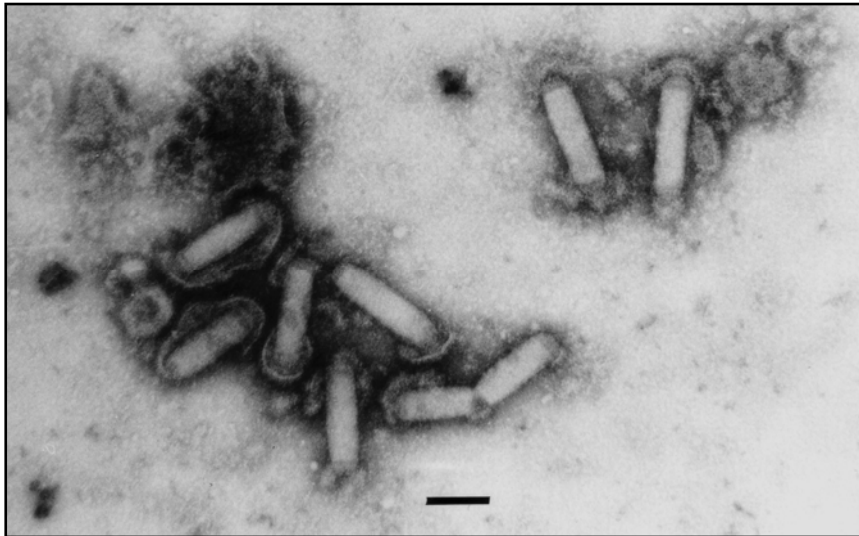
Abb. 35: Immunfluoreszenz an SF21 Zellen.

A) Nicht infizierte Zellen (Vergrößerung 1:100). B) Mit rPEC infizierte Zellen (Vergrößerung 1:100). C) und D) Mit rPEC infizierte Zellen (Vergrößerung 1:400), die positive Reaktion wird durch fluoreszierende Granula im Zytoplasma der Zellen gezeigt (weiße Pfeile). Erster Antikörper: polyklonales Kaninchenserum gegen humanes Sapovirus Kapsidprotein (1:500). Zweiter Antikörper: Cy3-markierter Ziege- α -Kaninchen Antikörper (1:500).

4.3.1.3 Produktion von PEC-VLPs

Zur Produktion von VLPs wurden SF21-Zellen mit einer MOI von 5 infiziert. Nach Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Dichtegradienten wurden Fraktionen mit der für PEC-VLPs beschriebenen Dichte ($1,33 \text{ g/cm}^3$) (Guo et al., 2001c) elektronenmikroskopisch untersucht. In diesen Fraktionen ließen sich mittels Negativkontrastierung vereinzelt Sapovirus-VLPs detektieren (Abb. 36 B). Die Konzentration an VLPs war jedoch nicht zufriedenstellend. Zur weiteren Absicherung wurden alle Fraktionen zweier Cäsiumchloridgradienten untersucht und die Anzahl gefundener VLPs in einer definierten Zeit (10 Min. pro Fraktion) ausgezählt. Diese Untersuchung zeigte, dass in den Fraktionen mit der Dichte von $1,33 \text{ g/cm}^3$ die größte Anzahl VLPs ($n = 9$) detektiert werden konnte.

A)



B)

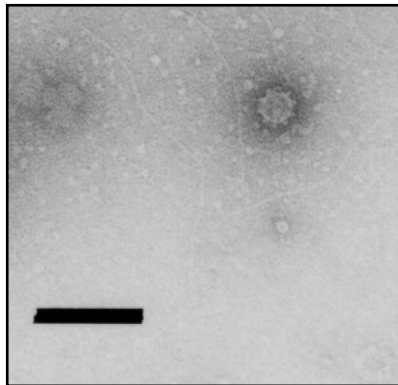
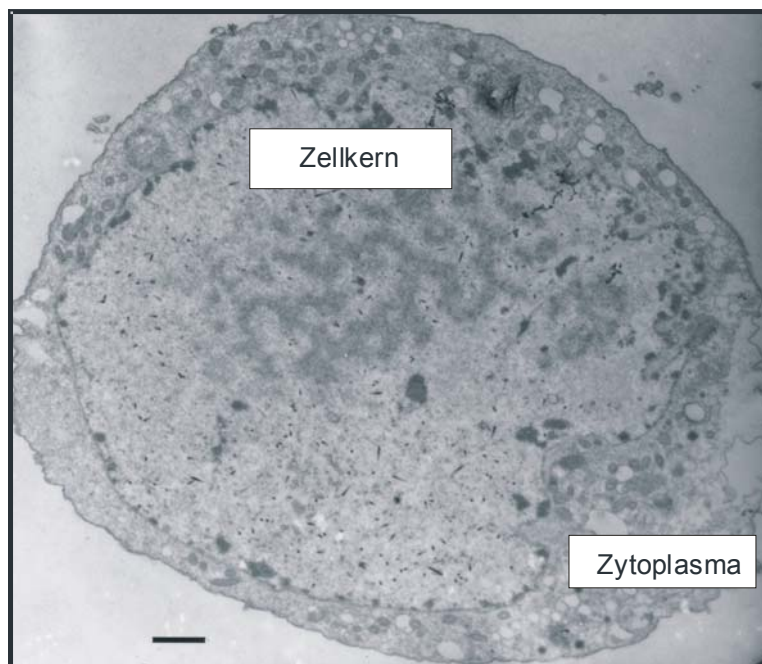


Abb. 36: Elektronenmikroskopische Bilder von Baculoviren und eines PEC-VLPs.

Negativkontrastierung mit 2% Methylaminowolframat. A) Baculoviren im Überstand von mit rekombinanten Baculoviren infizierten SF-21 Zellen. B) PEC-VLP nach Zentrifugation in einem Cäsiumchloridgradienten. Balken: 100 nm.

Zusätzlich wurden SF21-Zellen mit rPEC infiziert und 45 Stunden p. i. mit 2,5% Glutaraldehyd und 1% Osmiumtetroxid fixiert. Anschließend wurden die Zellen dehydriert und in Epoxidharz eingebettet. Nach Anfertigung von Ultradünnschnitten wurden diese mit Uranylacetat kontrastiert und im Transmissionselektronenmikroskop betrachtet. Baculoviren ließen sich in infizierten Zellen (Kern und Zytoplasma) in großer Zahl darstellen; PEC-VLPs wurden nicht gefunden (Abb. 37).

A)



B)

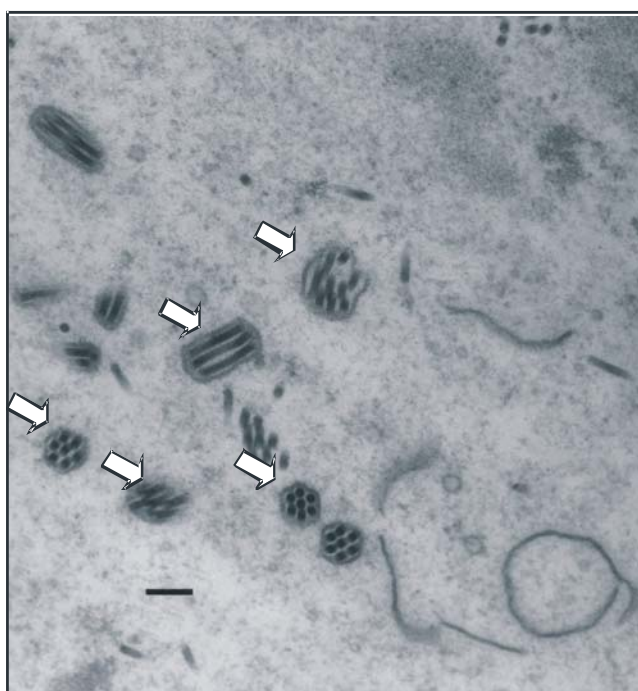


Abb. 37: Elektronenmikroskopisches Bild von SF21-Zellen.

A) Übersicht über eine SF21-Zelle. Balken: 1.000 nm. B) Detailansicht des Zytoplasmas einer SF21-Zelle. Baculoviren (weiße Pfeile) sind sichtbar in den Einschlusskörperchen (multiple Nukleokapside). Balken: 200 nm.

4.3.2 Co-Expression der Strukturproteine VP1 und VP2 von Noroviren sowie Sapoviren mit Hilfe rekombinanter Baculoviren

4.3.2.1 Grundlagen und Prinzipien der Expression

Da die Menge an VLPs, die mit dem beschriebenen rPEC produziert werden konnte, nicht zufriedenstellend war, wurde ein neuer Ansatz gewählt.

Eine Forschergruppe aus den USA hat für Noroviren gezeigt, dass die Co-Expression des Kapsidproteins VP1 und des kleinen basischen Strukturproteins VP2 eine Erhöhung der Stabilität der VLPs bewirkt und diese vor dem Verdau durch Proteasen schützt (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003) (Abb. 38). Daher wurden eigene Konstrukte entwickelt, die sowohl VP1 als auch VP2 beinhalten. Als Ausgangsprodukte dienten je zwei in der RT-PCR positive Kotproben von Rindern (bovines Norovirus) bzw. Schweinen (porzines enterales Sapovirus). Nukleinsäure wurde aus frisch aufgetautem Ausgangsmaterial aufgearbeitet und direkt in der RT-PCR eingesetzt. Dazu wurde zunächst mit einem oligoDT-Primer cDNS hergestellt und aus dieser nachfolgend die komplette Sequenz des VP1 und des VP2 der gefundenen porzinen enteralen Sapovirusisolate sowie der bovinen Norovirusisolate ermittelt. Anhand der Sequenzen dieser Isolate wurden nachfolgend Primer entwickelt, die den 5'-terminalen Bereich des VP1, den 3'-terminalen Bereich des VP2 sowie Schnittstellen für Restriktionsenzyme (kodierender Primer: XhoI, reverser Primer: HindIII) enthielten. Diese wurden verwendet, um jeweils das komplette Fragment in den Vektor pCR 2.1 TOPO® (Fa. Invitrogen) zu klonieren und nachfolgend in den Baculovirus-Expressionsvektor pBlueBachHis2A® (Fa. Invitrogen) zu subklonieren.

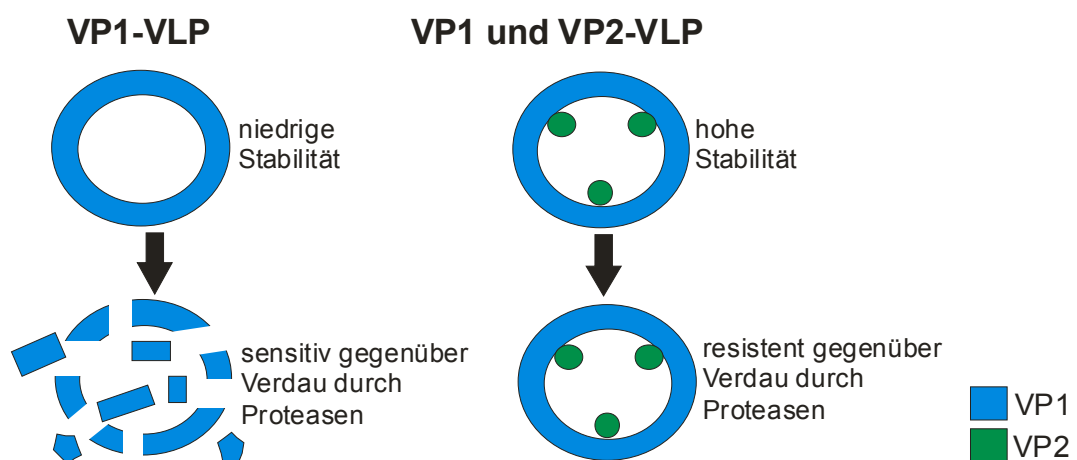


Abb. 38: Schematische Darstellung der Stabilisierung von VLPs durch VP2 nach Bertolotti-Ciarlet.

VP1-VLPs (blau) zeigen eine geringere Stabilität und sind sensitiv gegenüber Proteasen. VP2 (grün) erhöht die Stabilität und damit die Resistenz gegenüber dem Verdau durch Proteasen (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003).

Die Verwendung dieses Expressionsvektors, der eine 6 x Histidin-Sequenz enthält, optimiert das Expressionssystem, da sich das VP1 mit einem gegen den Histidin-Schwanz gerichteten Antikörper im Immunoblot nachweisen lässt. Ein Nachweis der Expression des Strukturproteins VP2 hingegen war nicht möglich, da kein spezifischer Antikörper vorhanden war und am C-Terminus des Konstruktes kein Marker angebracht wurde. Der Mechanismus der Expression des VP2 in vivo und in vitro ist zudem nicht geklärt. Vermutlich handelt es sich um einen Terminations-Reinitiations-Mechanismus, durch den VP2 von bicistronischer RNS translatiert wird (Meyers, 2003). Die Effizienz der Expression in vivo ist sehr gering: Pro Virion, das aus 90 Dimeren des VP1 aufgebaut ist, werden nur ein bis zwei Kopien des VP2 nachgewiesen (Green, 2007).

Die nachfolgende Abb. 39 zeigt den Aufbau der Konstrukte. 5'-terminal befindet sich im Vektor das Startkodon (rot markiert) sowie die Poly-Histidin-Region (rosa). Der für die Strukturproteine VP1 und VP2 kodierende Genomabschnitt wurde zwischen die in gelb markierte XhoI-Schnittstelle und die in türkis markierte HindIII-Schnittstelle ligiert. Das Stopkodon des VP2 wurde modifiziert, so dass das im Vektor integrierte Stopkodon (dunkelblau) verwendet wird. Das Stopkodon des VP1 hingegen wurde nicht modifiziert. Abb. 40 zeigt das gesamte Vorgehen zur Klonierung des gewünschten Fragmentes in den Baculovirusexpressionsvektor.

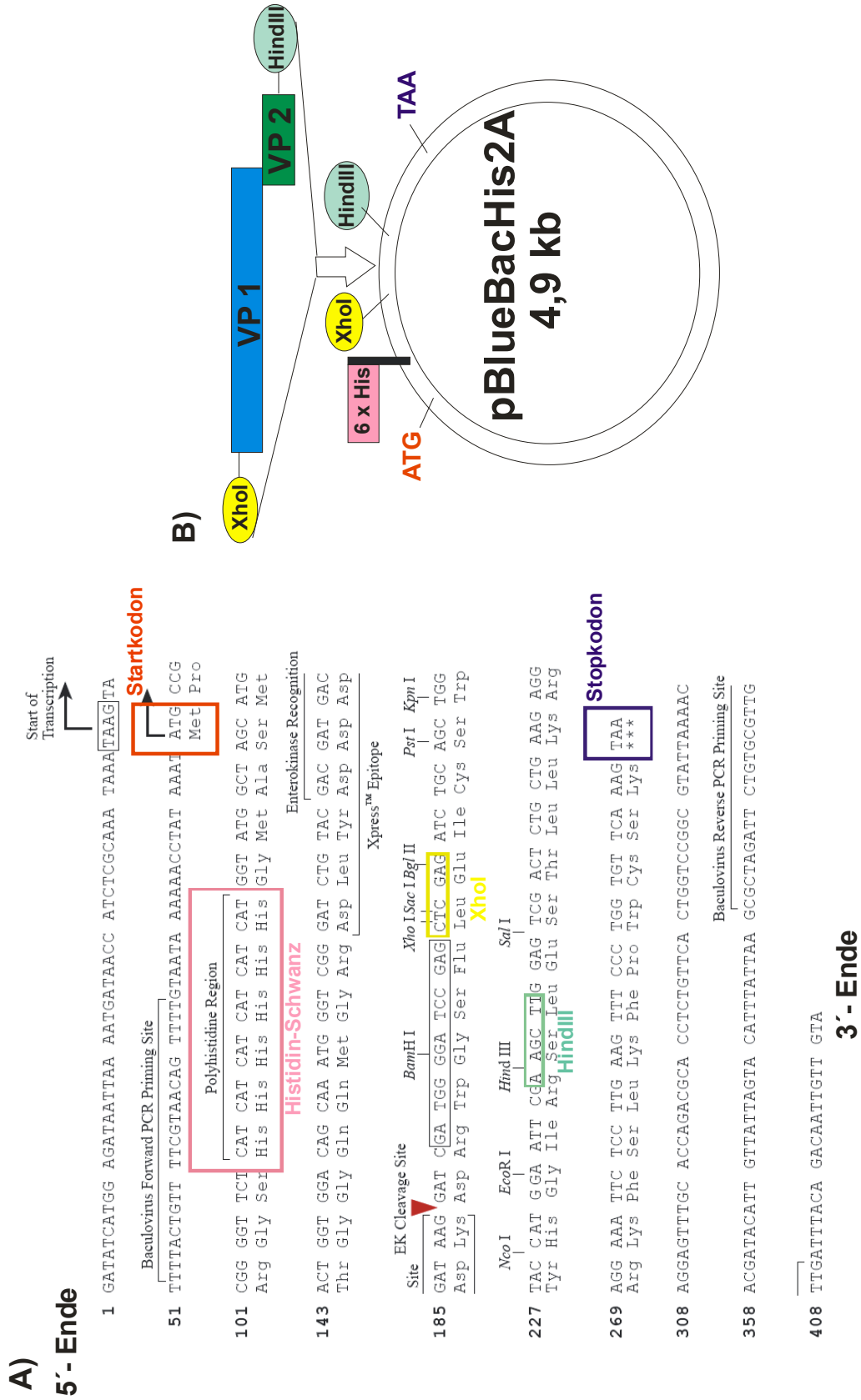


Abb. 39: Klonierung von VP1 und VP2 von Noro- und Sapoviren in den Baculovirus Transfervektor pBlueBacHis2A®.

A) Nuklein- und Aminosäuresequenz der Multiple Cloning Site des Vektors pBlueBacHis2A® (Fa. Invitrogen). B) Schematische Zeichnung der Konstrukte. Startkodon, Stopkodon, Histidin-Schwanz sowie die verwendeten Schnittstellen sind farblich markiert.

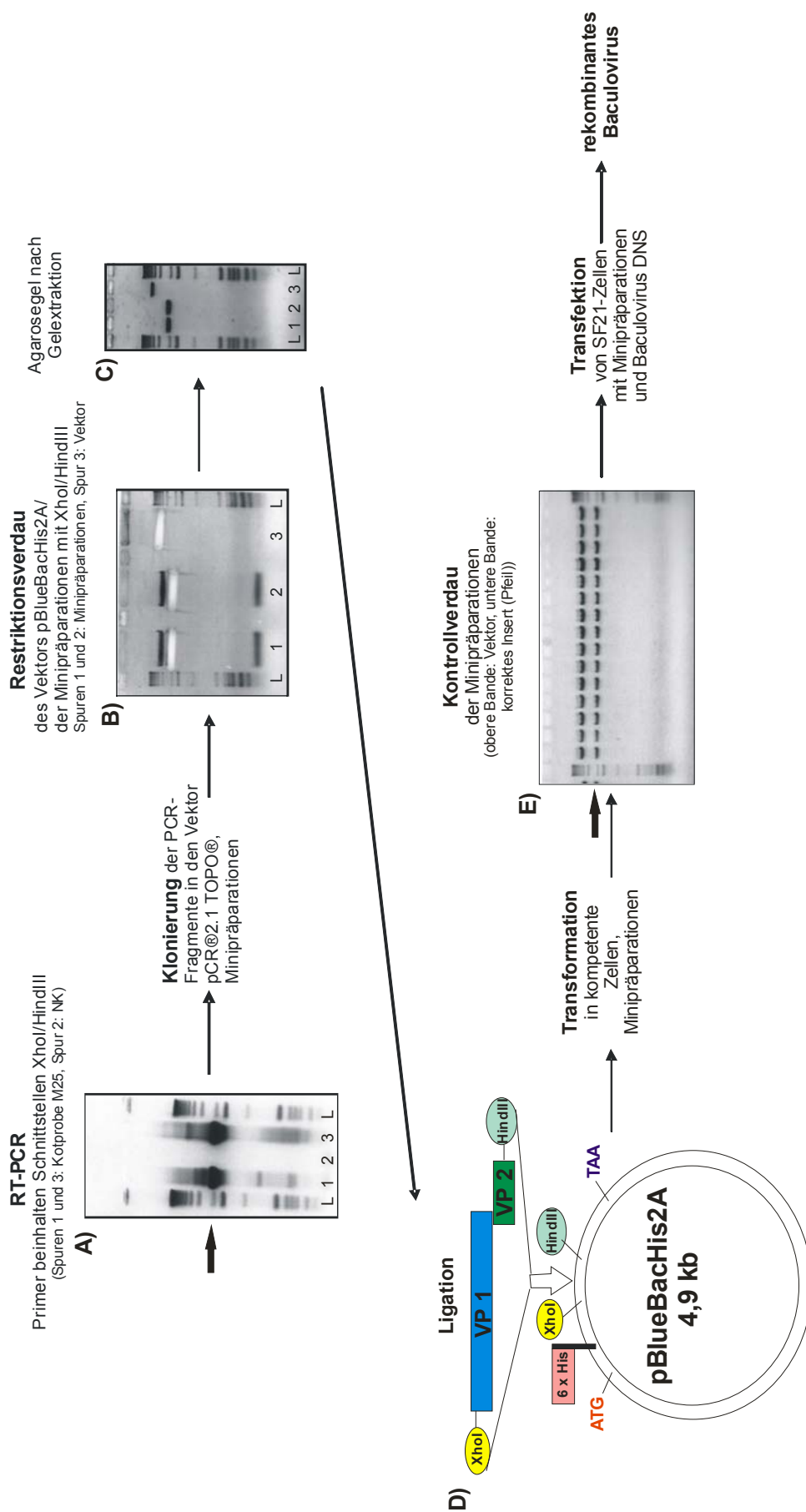


Abb. 40: Vorgehen zur Klonierung des gewünschten Fragmentes in den Baculovirusexpressionsvektor pBlueBacHis2A®.

Hier gezeigt: Ergebnisse für Sapovirus (Probe M25). Das entsprechende Norovirus-Konstrukt wurde analog hergestellt (Daten nicht gezeigt). Nach Amplifikation der gewünschten Fragmente (Pfeil) in der RT-PCR (A) wurden diese in den Vektor pCR 2.1 TOPO® kloniert und Minipräparationen hergestellt. Diese wurden anschließend zusammen mit dem Vektor pBlueBacHis2A® einem Restriktionsverdau unterzogen (B). Das Bild zeigt das Agarosegel nach dem Ausschneiden der Banden. C) Ausgeschnittene Banden nach Gelextraktion. Plasmid-DNS wurde in den Vektor pBlueBacHis2A® kloniert (D) und nach Transformation in kompetente Zellen Minipräparationen hergestellt. Diese wurden einem Restriktionsverdau unterzogen (E). Der Pfeil zeigt auf die Inserts korrekter Größe. Die Plasmid-DNS wurde anschließend verwendet, um zusammen mit linearisierter Baculovirus DNS SF21-Zellen zu transfizieren.

Zur Herstellung rekombinanter Viren wurde für porcine enterale Sapoviren als Ausgangsmaterial die Kotprobe KP070Schw. (rM25) und für bovine Noroviren die Kotprobe KP330Rd. (r18161) verwendet, nachdem jeweils beide Kotproben nach Sequenzierung die gewünschte Sequenzinformation lieferten. VP1 und VP2 wurden nach dem zuvor beschriebenen Verfahren in den Baculovirusexpressionsvektor kloniert. Vektor und linearisierte Baculovirus-DNS wurden verwendet, um SF21-Zellen wie beschrieben zu transfizieren. Der Transfektions-Virusstock (Zellkulturüberstand 72 Stunden p.i.) wurde im Plaquetest eingesetzt, in dem durch blau-weiß-Selektion Wildtyp-Baculoviren von rekombinanten Baculoviren unterschieden werden konnten.

Der Nachweis positiver Plaques erfolgte zunächst mit Hilfe der PCR (Primerpaar Baculo-f und Baculo-rev) durch Differenzierung zwischen Wildtyp und rekombinantem Baculovirus. Plaques, die nur den Wildtyp enthalten, weisen für den verwendeten Vektor eine Größe von 839 Bp auf; Plaques, die das korrekte Insert enthalten, eine Größe von 2.146 Bp (rM25) bzw. 2.220 Bp (r18161) plus Vektor (338 Bp). Die PCR diente zusätzlich zur blau-weiß-Selektion der Auswahl positiver Plaques, die anschließend zur Weitervermehrung genutzt wurden. Der Anteil der blauen Plaques gegenüber nicht eingefärbten Wildtyp-Plaques lag bei etwa 50%. Über die PCR mußten von diesen 50% wiederum etwa die Hälfte aussortiert werden, da sie rekombinantes und das Wildtyp-Virus enthielten. In einigen wenigen blauen Plaques konnte mit Hilfe der PCR nur Wildtyp-Virus nachgewiesen werden. Abb. 41 zeigt das Agarosegel mit den Amplifikaten, hergestellt unter Verwendung der Primer Baculo-f und Baculo-rev, die das Polyhedringen flankieren.

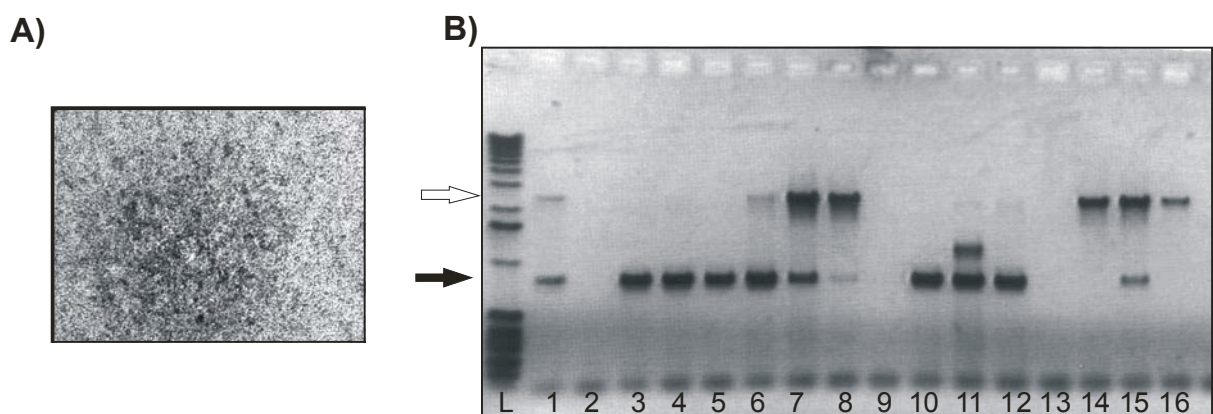


Abb. 41: Identifizierung rekombinanter rM25-Plaques.

A) Mikroskopisches Bild (Vergrößerung 1:100) eines Plaques. Erkennbar ist die starke Granulation der Zellen innerhalb des Plaques.

B) PCR zur Differenzierung zwischen Wildtyp und rekombinantem Baculovirus (Primerpaar Baculo-f/Baculo-rev). Spuren 3, 4, 5 und 10: Wildtyp-Baculovirus (839 Bp, unterer Pfeil). Spuren 14 und 16 enthalten das korrekte rekombinante Virus (2.146 Bp plus Vektor (338 Bp) (oberer Pfeil)). Spuren 1, 6, 7, 8, 12 und 15: Wildtyp und rekombinantes Virus enthaltende Plaques. Spuren 2, 9 und 13: Negativkontrollen. Spur 11: Wildtyp und inkorrektes Insert. L: 1 Kb-Größenmarker. 1,5%-iges Agarosegel.

Virus aus Plaques, die nur das rekombinante Virus enthielten, wurden angezüchtet, erneut Plaque-gereinigt und wiederum in der PCR untersucht. Insgesamt wurden für rM25 15 positive Plaques identifiziert, für r18161 17 positive Plaques. Jeweils zwei rekombinante Baculoviren aus positiven Plaques wurden zusätzlich sequenziert, um die Korrektheit der Sequenz sicherzustellen.

Da der Baculovirusexpressionsvektor pBlueBacHis2A[®] einen 6 x Histidinrest aufweist, der an den N-Terminus des rekombinanten Proteins fusioniert, können die exprimierten Proteine mit Hilfe eines α -penta-His-Antikörpers (Verdünnung 1:2.000) im Western Blot leichter detektiert werden. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) verwendet. Sowohl für rM25 als auch für r18161 gelang der Nachweis eines Proteins der erwarteten Größe des VP1 im Western Blot. Nachfolgend wurden aus den Plaques rM25P8 und r18161P10 Virusstocks hergestellt. Das VP2 besitzt multiple molekulare Massen von 23 kDa und 35 kDa (Glass et al., 2000a). Die Coomassie-Färbungen zeigten keine Banden in dieser Größe.

Die nachfolgenden Kapitel zeigen den Nachweis der Expression des VP1 von porcinen enteralen Sapoviren sowie bovinen Noroviren mit Hilfe der hergestellten rekombinanten Baculoviren rM25 (SaV) und r18161 (NoV).

4.3.2.2 Porzines enterales Sapovirus (rM25)

4.3.2.2.1 Nachweis der Expression des Kapsidproteins VP1

Abb. 42 A zeigt einen Western Blot, in dem die Expressionsprodukte zweier rekombinanter Baculoviren (rM25 (rM25P8, rM25P10)) drei Tage p.i. getestet wurden. Dabei fällt auf, dass das VP1 zwar in größerer Menge im Zelllysats nachgewiesen werden konnte (Spuren 4 und 5), jedoch auch im Überstand gefunden wurde (Spuren 1 und 2). Dies war für das weitere Vorgehen von entscheidendem Vorteil, da die VLPs direkt aus dem Überstand verhältnismäßig sauber gewonnen werden können. Der weiße Pfeil zeigt mutmaßliche Dimere und Trimere des Proteins. Weitere Produkte geringerer Molekularmasse sind im Zelllysats zu sehen, die eventuell durch Proteolyse entstanden sind.

Abb. 42 B zeigt einen Western Blot, in dem Überstände einer Verlaufskinetik mit rM25P8 getestet wurden. Dabei sollte untersucht werden, ab welchem Zeitpunkt das rM25 im Überstand detektiert werden kann. Das Protein konnte ab 48 Stunden p.i. im Überstand nachgewiesen werden und zeigte bis 120 Stunden p.i. keine proteolytische Degradation. Der weiße Pfeil zeigt mutmaßliche Dimere. Vereinzelt schwache Banden geringeren Molekulargewichtes konnten zwischen 48 und 72 Stunden p.i. detektiert werden.

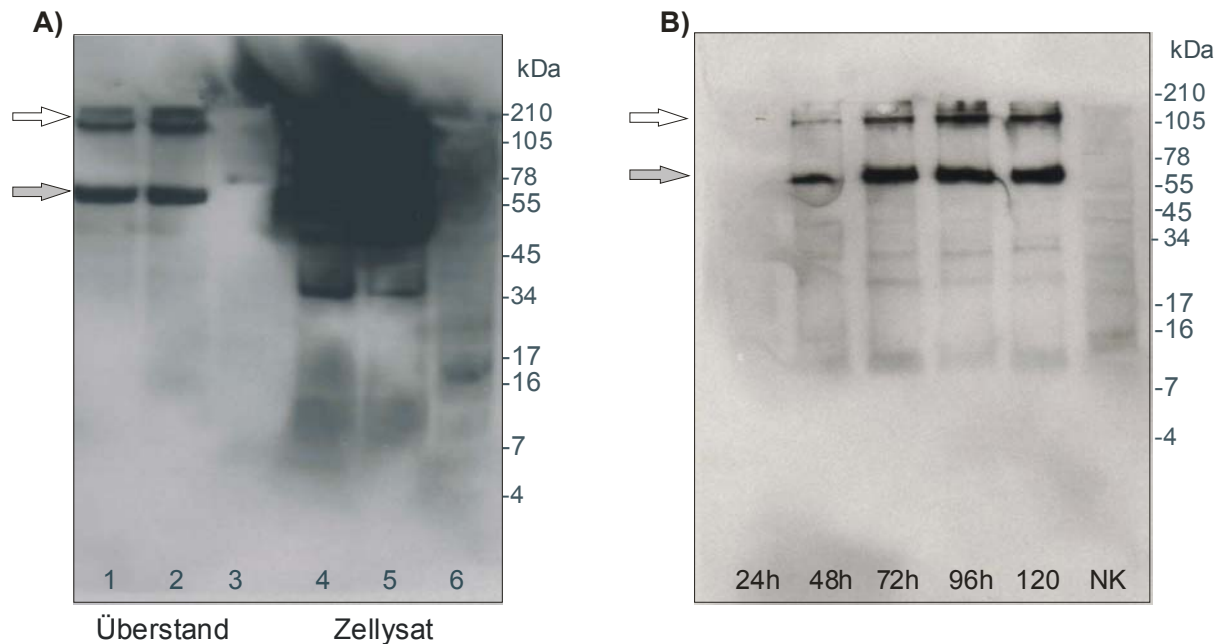


Abb. 42 : Western Blot von rM25 (porzine enterale Sapovirus VLPs).

Verwendete Antikörper: Primärantikörper: α -penta-His-Antikörper (Verdünnung 1:2.000), Sekundärantikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:10.000).

A) Spur 1: rM25P8, Überstand, Spur 2: rM25P10, Überstand, Spur 3: Überstand nicht infizierter SF21-Zellen. Spur 4: rM25P8 Zelllysate, Spur 5: rM25P10 Zelllysate, Spur 6: Zelllysate nicht infizierter SF21-Zellen. Deutlich erkennbar ist die wesentlich größere Menge an rM25 in den Zelllysaten (Spuren 4 und 5). Grauer Pfeil: Banden der erwarteten Größe (58 kDa). Weißer Pfeil: vermutlich Dimere und Trimere. Nicht charakterisierte Produkte geringerer Molekularmasse sind im Zelllysate zu sehen.

B) Verlaufskinetik der Expression des rM25P8 (Überstände). Erwartete Banden in der Höhe von 58 kDa sind ab 48 Stunden p.i. erkennbar. Grauer Pfeil: Banden der erwarteten Größe (58 kDa). Weißer Pfeil: vermutlich Dimere.

Anschließend wurde aus dem rekombinanten Baculovirus rM25P8 ein Virusstock mit einem Titer von $2,5 \times 10^6$ pfu/ml generiert. Dieser war Ausgangsmaterial für das weitere Vorgehen.

4.3.2.2.2 Produktion von porzinen enteralen Sapovirus-VLPs

Nach Infektion von SF21-Zellen (MOI = 3) mit rM25P8 wurden Zellen und Überstand drei Tage p.i. geerntet und Überstand und Zelllysate zusammen über einen CsCl-Dichtegradienten gereinigt. Nach dem Lauf wurden 500 μ l-Fractionen gesammelt, deren Brechungsindex gemessen und daraus die Dichte errechnet. Fractionen in der Nähe der erwarteten Dichte ($1,33 \text{ g/cm}^3$) (Guo et al., 2001c) wurden elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein von VLPs untersucht. Die nachfolgende Abb. 43 A zeigt eine Coomassie-Färbung von Material der Fractionen 2 bis 10, von denen jeweils gleiche Volumina aufgetragen wurden. Der graue Pfeil zeigt auf Banden der erwarteten Größe (58 kDa). Spur 5 ist hierbei die Peakfraction des Gradienten, in der die Mehrzahl der VLPs vermutet wird ($1,33 \text{ g/cm}^3$). Ebenfalls erkennbar sind vermutliche Dimere und ein etwa 7 kDa großes unbekanntes Protein. Abb. 43 B zeigt einen Western Blot der Fractionen 2 bis 8, von denen ebenfalls die gleichen Mengen aufgetragen wurden.

Gut sichtbar ist, dass die Mehrzahl des Proteins sowohl in der Coomassie-Färbung als auch im Western Blot in den Fractionen 5 bis 8 zu finden ist.

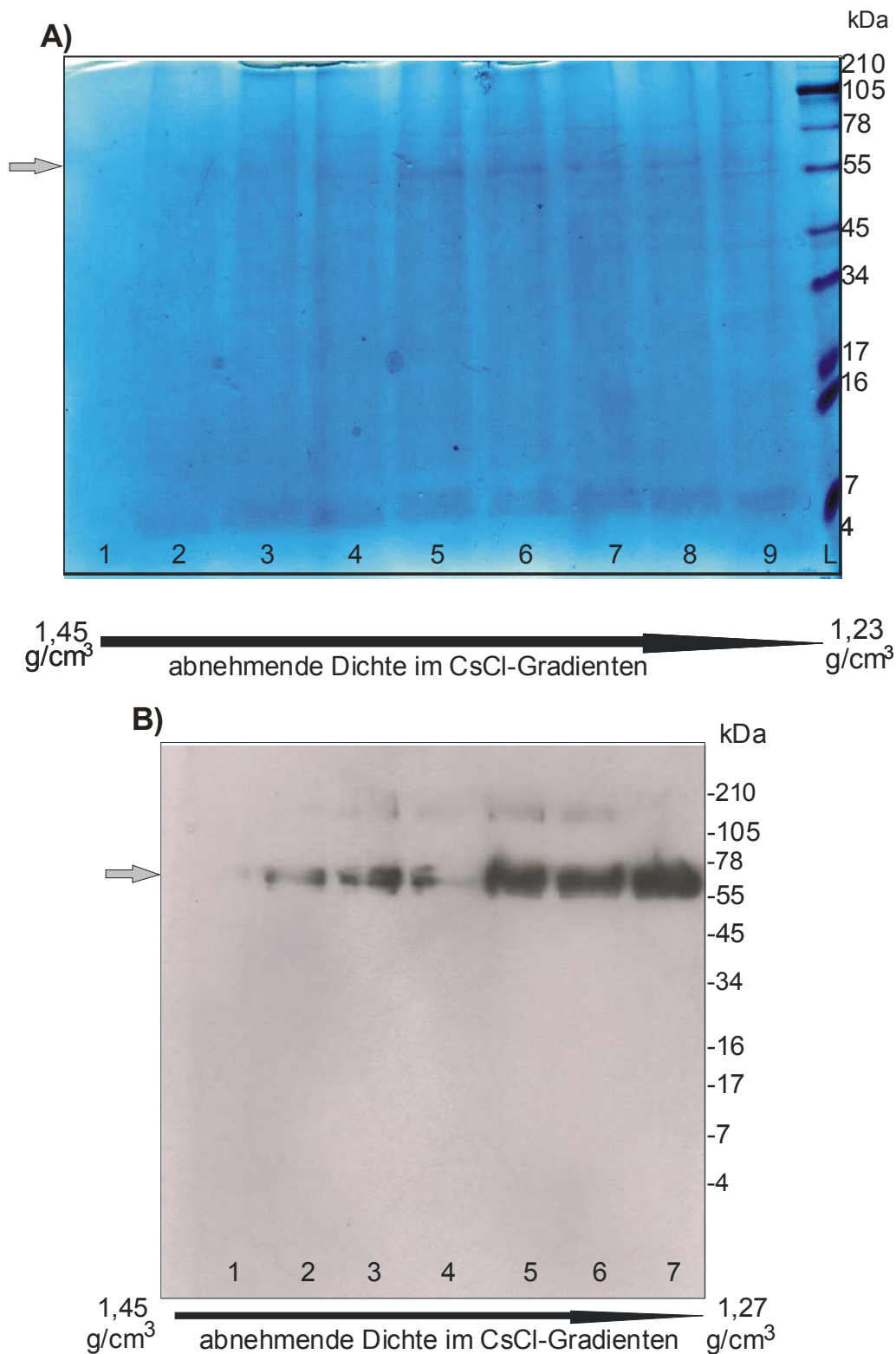


Abb. 43: A) Coomassie-Färbung und B) Western Blot einzelner Fraktionen der Gradientenreinigung von rM25.

A) Aufgetragen wurden gleiche Volumina der Fraktionen 2 bis 10 (Spuren 1 bis 9) der CsCl-Gradientenreinigung (Überstand und Zelllysat infizierter Zellen). Der graue Pfeil zeigt auf Banden der korrekten Größe (58 kDa). Spur 5: Peakfraktion des Gradienten. Zusätzlich ist ein etwa 7 kDa großes nicht charakterisiertes Protein zu erkennen. B) Aufgetragen wurden gleiche Mengen der Fraktionen 2 bis 8 (Spuren 1 bis 7). Grauer Pfeil: Banden der erwarteten Größe (58 kDa). Zusätzlich sind Banden zu erkennen, die vermutlich Dimere darstellen. Verwendete Antikörper: Primärantikörper: α -penta-His-Antikörper (Verdünnung 1:2.000), Sekundärantikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:10.000).

A) und B): Der schwarze Pfeil zeigt in Richtung der abnehmenden Dichte.

Die Fraktionen 5 und 6, die die Dichte aufwiesen, in der die Mehrzahl der VLPs vermutet wurde, wurden elektronenmikroskopisch untersucht; es konnten jedoch keine VLPs gefunden werden. Dies lag vermutlich an einer zu geringen Menge von VLPs. Die Menge an nachweisbarem Gesamtprotein lag nur bei 115,11 µg/ml, gemessen mit Hilfe des BCA-Tests.

4.3.2.3 Bovines Norovirus (r18161)

4.3.2.3.1 Nachweis der Expression des Kapsidproteins VP1

Abb. 44 zeigt den Nachweis des Kapsidproteins VP1 (bovines Norovirus), das mit Hilfe rekombinanter Baculoviren exprimiert wurde, im Western Blot. Als Ausgangsmaterial diente hier der nach Infektion erhaltene Überstand ausgehend von zwei rekombinanten Baculoviren (r18161P10 und r18161P12). Beide zeigten eine Bande in der erwarteten Größe (57 kDa); die Menge an spezifischem Protein erscheint in der zweiten Spur etwas höher.

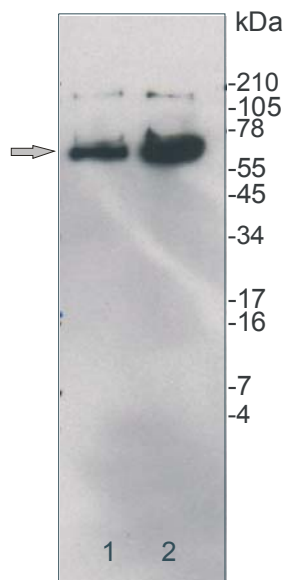


Abb. 44: Western Blot von Überstand von r18161P10 und r18161P12.

Banden der erwarteten Größe (57 kDa) sind erkennbar. Der Gehalt an Protein in Spur 2 (r18161P10) erscheint etwas höher zu sein als in Spur 1 (r18161P12).

Verwendete Antikörper: Primärantikörper: α -penta-His-Antikörper (Verdünnung 1:2.000), Sekundärantikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:10.000).

4.3.2.3.2 Produktion von bovinen Norovirus-VLPs

Nach Herstellung eines hochtitrigen Virusstocks ($3,5 \times 10^7$ pfu/ml) wurden SF21-Zellen mit r18161P10 infiziert (MOI = 10) und Überstand und Zellen drei Tage p.i. geerntet. Aufgrund des höheren Titers des Virusstocks konnte hier eine höhere MOI als bei rM25 eingesetzt werden. Die Aufreinigung der VLPs erfolgte ebenfalls durch Zentrifugation in einem CsCl-Dichte-Gradienten, wobei hier für die Reinigung aus Überstand bzw. Zelllysate verschiedene Gradienten eingesetzt wurden. Bovine Norovirus-VLPs weisen dabei eine Dichte von $1,31 \text{ g/cm}^3$ auf (Han et al., 2005). Die Fraktion mit der erwarteten Dichte wies einen Gesamtproteingehalt von 577,64 µg/ml auf. Abb. 45 A zeigt eine Coomassie-Färbung des Gradienten ausgehend vom Überstand, Abb. 45 B Coomassie-Färbung und Western Blot

einer Fraktion der Gradientenreinigung des Überstandes, einer Fraktion des Zelllysates sowie eines Überstandes von nicht-infizierten SF21-Zellen. In der Coomassie-Färbung ist eine weitere Bande in der Höhe von etwa 55 kDa erkennbar, die ein Degradationsprodukt darstellen könnte. Durch Einsatz von Überständen nicht-infizierter Insektenzellen im Western Blot konnte die Spezifität des eingesetzten Antikörpers gezeigt werden; es waren nur nicht charakterisierte Produkte mit niedrigerer molekularer Masse zu sehen.

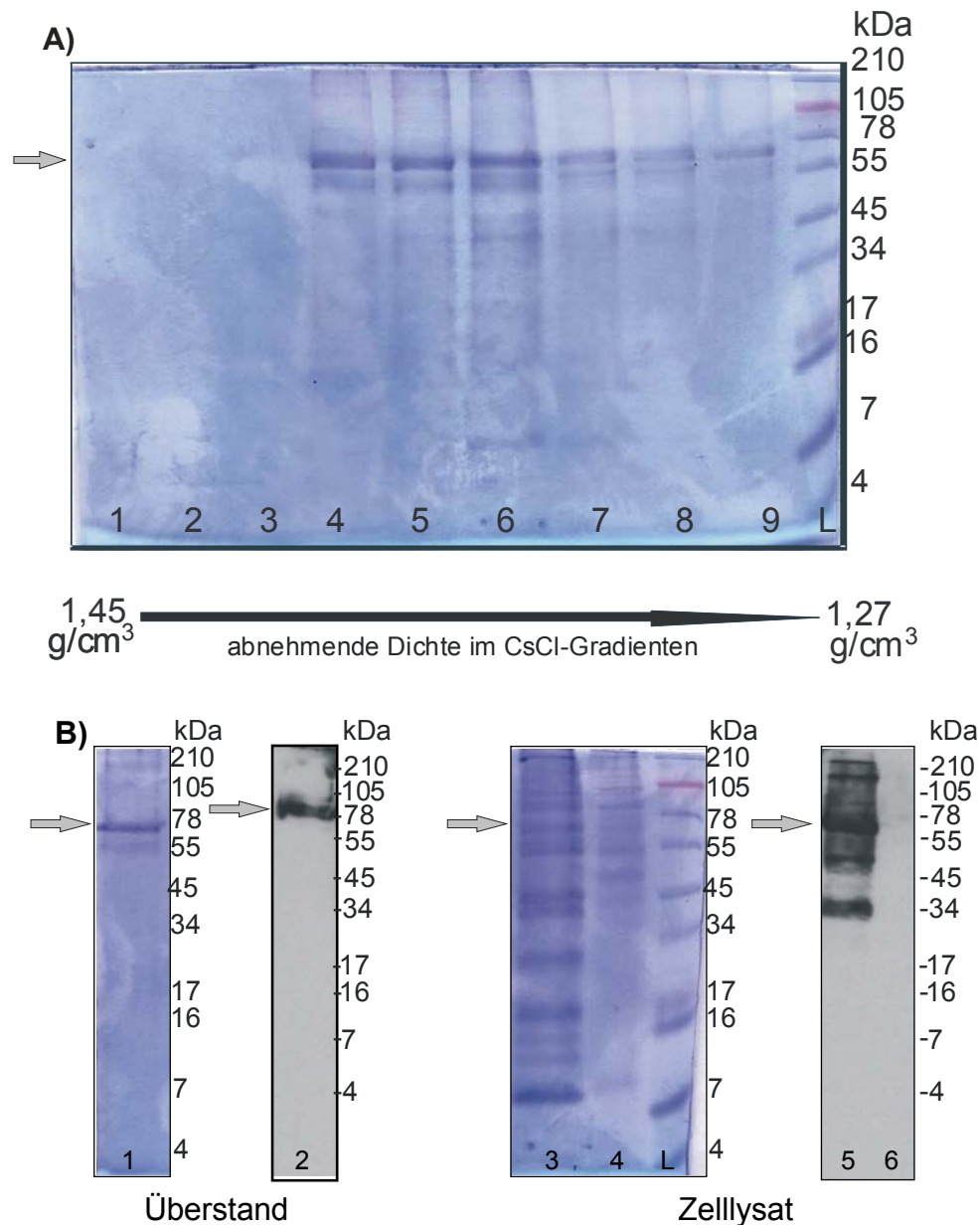


Abb. 45: Coomassie-Färbung und Western Blot einzelner Fraktionen der Gradientenreinigung von r18161.
A) Coomassie-Färbung der Fraktionen des Überstandes von r18161 nach CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Spuren 1 bis 9: Fraktionen 2 bis 10 der Gradientenreinigung mit abnehmender Dichte. Der graue Pfeil gibt die Bande der erwarteten Größe an (57 kDa). Spur 6: Peakfraktion des Gradienten (Dichte: 1,31 g/cm³).
B) Coomassie-Färbung (Spuren 1, 3 und 4) und Western Blot (Verwendete Antikörper: Primärantikörper: α -penta-His-Antikörper (Verdünnung 1:2.000), Sekundärantikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) (Spuren 2, 5 und 6)) verschiedener Fraktionen sowie nicht-infizierter Zellen. Spuren 1 und 2: Fraktion 6 der Gradientenreinigung (Überstand). Spuren 3 und 5: Fraktion 5 der Gradientenreinigung (Zelllysate). Neben der Bande in der erwarteten Größe (grauer Pfeil) sind weitere Banden zu erkennen. Diese stellen Zellproteine (Coomassie-Färbung) und eventuell Degradationsprodukte (Western Blot) dar. Spuren 4 und 6: Überstand nicht-infizierter SF-21 Zellen.

In den Fraktionen 5 und 6 des Überstandes konnten elektronenmikroskopisch Norovirus-VLPs nachgewiesen werden (Abb. 46). Dabei traten VLPs unterschiedlicher Größe auf, wie sie bereits für Sapoviren beschrieben wurden (Hansman et al., 2005a). Auch für Noroviren wurden Partikel zwischen 5 nm (P-Partikel aus 12 Dimeren der P-Domäne) (Tan und Jiang, 2005a) und 23 nm (60 Dimere des VP1) beschrieben (White et al., 1997). Zusätzlich wurden größere Norovirus-ähnliche Strukturen gefunden, die in einer Größe von 45 nm ebenfalls bereits beschrieben wurden (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002).

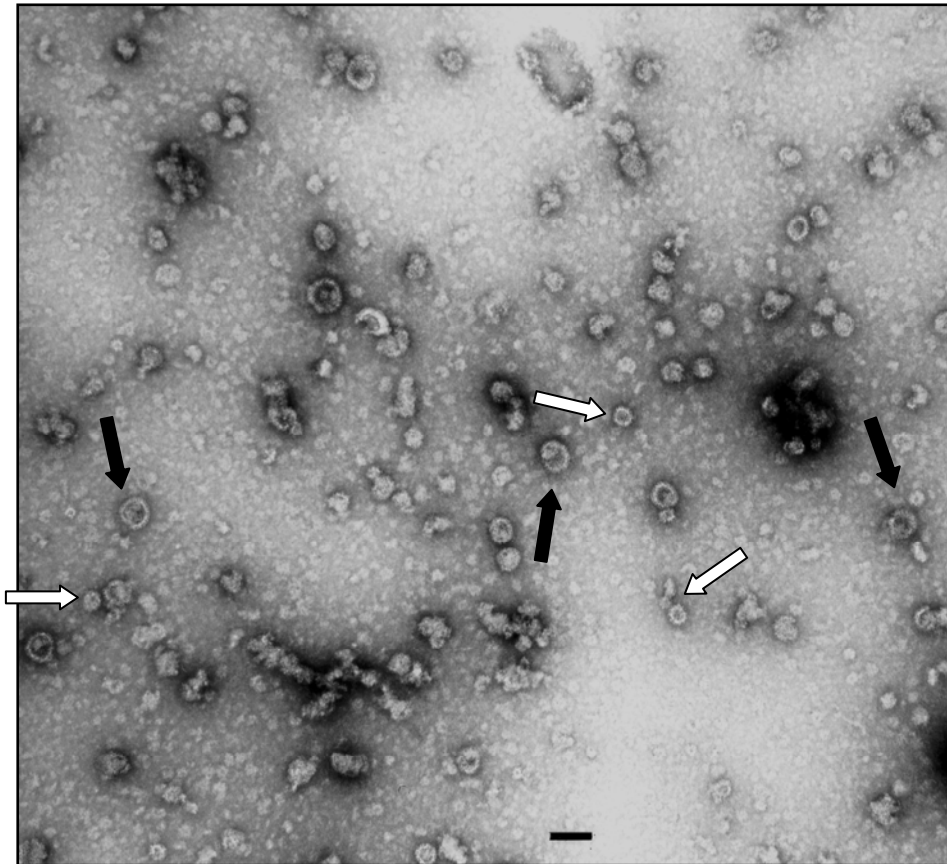


Abb. 46: Elektronenmikroskopisches Bild von Norovirus-VLPs (Negativkontrastierung).
Typische Noroviruspartikel (weiße Pfeile). Schwarze Pfeile zeigen auf Partikel inkorrekt Größe. Balken: 100 nm.

4.3.3 Zusammenfassung: Produktion von VLPs

Mit Hilfe des Baculovirusexpressionssystems gelang es in dieser Arbeit, das VP1 sowohl des porcinen enteralen Sapovirus als auch des bovinen Norovirus zu exprimieren. Der Nachweis für den Zusammenbau von VLPs konnte für das bovine Norovirus durch das elektronenmikroskopische Bild geführt werden, nicht jedoch für das porcine enterale Sapovirus.

Mit den produzierten rekombinanten Baculoviren stehen nun diagnostische Reagenzien zur Verfügung, um beispielsweise die Seroprävalenz von Antikörpern gegen porcine enterale Sapoviren und bovine Noroviren bei Rindern, Schweinen oder auch beim Menschen zu bestimmen.

5 Diskussion

Vertreter der Genera *Norovirus* und *Sapovirus* aus der Virusfamilie der *Caliciviridae* stellen wichtige Erreger epidemisch verlaufender Gastroenteritiden beim Menschen dar. Insbesondere Erkrankungen, die durch Noroviren hervorgerufen werden, gelangen wegen des gehäuftten Auftretens in den Wintermonaten in das öffentliche Interesse. Dennoch war der Terminus Norovirus in der Bevölkerung bislang weitgehend unbekannt; er ist erst seit Beginn der Wintersaison 2006/2007 durch Krankheitsausbrüche, beispielsweise auf dem Kreuzfahrtschiff „Queen Mary II“ und durch Teilschließungen von Krankenhäusern wie etwa in Marburg, auch unter Nicht-Medizinern ein Begriff.

Noroviren wurden bereits 1972 entdeckt (Kapikian et al., 1972) und verursachen beim Menschen 67% aller über Nahrungsmittel verbreiteten Gastroenteritiden (Mead et al., 1999). Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine sehr kurze Inkubationszeit (15 bis 36 Stunden), gefolgt von einer akuten, selbstlimitierenden Diarrhöe (Simpson et al., 2003). In 50% der Fälle tritt zusätzlich projektiles Erbrechen auf (Kaplan et al., 1982a). Der Nachweis von Noroviren unterliegt in Deutschland der Meldepflicht nach §7 des Infektionsschutzgesetzes; in den USA gelten Noroviren als „biodefense category B priority pathogen“.

Zu den animalen Noroviren gehören die bovinen Noroviren (Woode und Bridger, 1978; Günther und Otto, 1987), die bei Rindern im Zusammenhang mit Anorexie sowie einer malabsorptiven und maldigestiven Diarrhöe gefunden wurden. Sie konnten als kausales Agens einer Diarrhöe bei experimentell infizierten, kolostrumfrei aufgezogenen Kälbern identifiziert werden (Liu et al., 1999). Das porcine Norovirus wurde aus dem Kot gesunder Schweine isoliert (Sugieda et al., 1998; Wang et al., 2005a).

Humane Sapoviren kommen wesentlich seltener vor als Noroviren und verursachen gastrointestinale Erkrankungen hauptsächlich bei Kindern unter fünf Jahren (Chiba und Nakata, 2000). Sapovirusinfektionen führen ebenfalls zu Diarrhöe; das Auftreten des für Noroviren typischen Erbrechens fehlt jedoch meist (Simpson et al., 2003). Sapoviren konnten auch aus dem Kot von Schweinen isoliert werden (porzines enterales Sapovirus (PEC)) und verursachten im Tierversuch Diarrhöe mit Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie im proximalen Jejunum (Saif et al., 1980).

Über die Verbreitung animaler Noro- und Sapoviren in Deutschland und ihre Bedeutung als Krankheitserreger ist bisher nur wenig bekannt. Die Möglichkeit einer zoonotischen Übertragung kann nicht ausgeschlossen werden. Eventuell stellen landwirtschaftliche

Nutztiere ein Reservoir für die Infektion beim Menschen dar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten unter anderem einen Beitrag zur Risikoabschätzung des Vorkommens von animalen Noro- und Sapoviren für die menschliche Gesundheit leisten. Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob ein Bedarf zur Entwicklung von diagnostischen Tests oder Impfstoffen für Nutztiere vorhanden ist.

Dazu wurden Kot- und Organproben von Rindern und Schweinen gesammelt und mit Hilfe eines Fragebogens anamnestisch dokumentiert. Anhand breit reagierender Nachweisverfahren (RT-PCR), bei denen Primer verwendet wurden, die alle Genogruppen des jeweiligen Genus detektieren, wurden die Proben auf das Vorliegen virusspezifischer RNS untersucht. Die PCR-Produkte aus positiven Proben wurden nachfolgend kloniert, sequenziert und phylogenetisch analysiert. Anhand dieser Analysen konnte der Grad der Verwandtschaft der gefundenen Isolate untereinander und zu humanen Isolaten ermittelt werden. Das Hauptaugenmerk der Arbeit lag auf der möglichen Detektion humaner Isolate bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Die Eintragungen der Fragebögen wurden abschließend im Hinblick auf statistisch signifikante Zusammenhänge bestimmter Parameter zu einer Noro- oder Sapovirusinfektion untersucht.

Die in dieser Arbeit als „Isolate“ bezeichneten Viren stellen keine Virusisolate im herkömmlichen Sinne dar, da aufgrund des Fehlens eines Zellkulturmodells kein Virus angezüchtet werden konnte. Der Ausdruck Isolat bezeichnet somit im Folgenden Viren, von denen Nukleinsäureteilsequenzen bestimmt wurden.

Den zweiten Schwerpunkt der Arbeit bildete die Produktion von virusähnlichen Partikeln (VLPs). Das Kapsidprotein VP1 von Noro- und Sapoviren hat die Eigenschaft, nach Expression in heterologen Systemen zu VLPs zu aggregieren, die den nativen Virionen morphologisch und antigenetisch sehr ähnlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten bovine Norovirus-VLPs sowie porcine enterale Sapovirus-VLPs produziert werden, die für spätere Studien zur Verfügung stehen, beispielsweise als Antigen für ein ELISA-System.

5.1 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Forschungsarbeiten über Noro- und Sapoviren werden wesentlich durch die Tatsache erschwert, dass kein Zellkultursystem zur Vermehrung dieser Viren vorliegt. Daher ist die RT-PCR die Methode der Wahl zur Detektion von Noro- und Sapoviren. Die Elektronenmikroskopie (Immunelektronenmikroskopie unter Verwendung von Rekonvaleszentenseren) ist als Untersuchungsverfahren in den Hintergrund getreten (Glass et al., 2000b), da sie mit einer niedrigen Sensitivität einhergeht und daher nur bei Proben mit hohen Viruspartikelmengen anwendbar ist. Insbesondere Norovirionen, bei denen die typischen morphologischen Eigenschaften der Caliciviren nicht so stark ausgeprägt sind,

können nur durch einen erfahrenen Diagnostiker detektiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten elektronenmikroskopischen Bilder von Noroviruspartikeln aus der Kotprobe eines Rindes (Abb. 16) sowie Sapoviruspartikeln aus der Kotprobe eines Schweines (Abb. 30) konnten erst nach Einsatz der Flüssigphasen-Immunelektronenmikroskopie und eingehender Untersuchung der Präparate identifiziert werden.

Die Klonierung und Sequenzierung der Genome von Norwalk Virus und Southampton Virus erlaubte die Entwicklung von Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion-Assays, durch deren Einführung der Durchbruch in der Diagnostik von Noro- und Sapovirusinfektionen gelang (de Leon et al., 1992; Jiang et al., 1992a; Moe et al., 1994; Jiang et al., 1995). Vorteile der RT-PCR sind zum einen die hohe Sensitivität, zum anderen die hohe Spezifität, mit der bereits durch Verwendung spezifischer Primerpaare eine Einteilung in Genogruppen möglich ist.

Die hohe Spezifität der RT-PCR birgt vor dem Hintergrund der genetischen Variabilität von Caliciviren die Gefahr, dass einzelne Virusisolate durch Mutationen im entsprechenden Genomabschnitt von einem Nachweisverfahren nicht erfasst werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit degenerierte Primerpaare verwendet, die zudem Genombereiche detektieren, die zwischen den einzelnen Genogruppen der Noroviren (Vennema et al., 2002) bzw. Sapoviren (Vinje et al., 2000a) stark konserviert sind. Aufgrund der Heterogenität der Erkennungssequenzen bei den verschiedenen Genogruppen wurden degenerierte Primer verwendet. Diese bedingen eine extrem niedrige Annealingtemperatur von 37°C bei der RT-PCR-Reaktion. Die Wahl degenerierter Primer und der damit bedingten niedrigen Annealingtemperatur birgt die Gefahr einer Vielzahl falsch positiver Ergebnisse, da die Primer sich auch an nicht virale Sequenzen anlagern und es so zu unerwünschten PCR-Amplifikaten kommen kann. Eine Auflistung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgekommenen falsch positiven Amplifikate zeigen Tab. 24 und Tab. 30. Neben zellulären Sequenzen konnten auch Nukleinsäurefragmente von Bakterien wie Chlamydien und Clostridien detektiert werden. Außerdem gelang der Nachweis zusätzlicher viraler Erreger. Dazu gehört zum einen die Detektion von bovinem Rotavirus (Probe KP201Rd.) mit dem Primerpaar SR80(+)/JV33. Des Weiteren konnte eine dem Kobuvirus ähnliche Sequenz in einer Probe (KP464Rd.) mit Hilfe des Primerpaares JV12Y/13I gefunden werden. Kobuvirus gehört neben Aichi Virus zum Genus *Kobuvirus*, einem von sieben Genera innerhalb der Familie *Picornaviridae* und wurde ursprünglich in Japan aus einer Zellkultur isoliert (Genbank-Zugangsnummer AB084788) (Yamashita et al., 2003). In einer nachfolgenden Studie wurden in 16,7% von 72 Kotproben gesunder Rinder Kobuvirus gefunden. Mit Hilfe des Primerpaares SR80(+)/JV33 konnte auch felines Calicivirus (Genus *Vesivirus*) aus

Darmmaterial einer Katze detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen das breite Detektionsspektrum der verwendeten Primer.

Bei Verwendung dieser Primerpaare und Bedingungen ist daher eine Verifizierung der RT-PCR-Ergebnisse durch eine weitere Analyse der positiven PCR-Produkte zwingend erforderlich. Dazu kann neben der in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierung auch eine nested PCR verwendet werden, die beispielsweise spezifisch für bovine Noroviren der Genogruppe III ist. Eine solche nested PCR wird derzeit validiert, da die Sequenzierung im Rahmen einer diagnostischen Routineuntersuchung zu aufwändig ist.

5.2 Nachweis von Noroviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 546 Kot- und Organproben von Rindern mit Hilfe der RT-PCR auf das Vorkommen von Norovirus-RNS getestet. Davon waren 32 Proben positiv. Diese Prävalenz von 5,9% entspricht in etwa den Ergebnissen von Studien aus Belgien (6,9%) (Scipioni et al., 2004), Großbritannien (8,0%) (Oliver et al., 2003) und Italien (9,6%) (Santoni et al., 2004), bei denen das gleiche Untersuchungsverfahren gewählt wurde (Tab. 3). Eine 2003 in Deutschland veröffentlichte Studie mit einem Antigen-ELISA (Jena-Virus) unter Einbeziehung von 381 Kotproben von Rindern aus Thüringen, Hessen und Bayern ergab eine Prävalenz von 8,9% (Deng et al., 2003). Eine zweite für Deutschland veröffentlichte Studie untersuchte 41 Kotproben von Kälbern mit Diarrhöe mit für bovines Norovirus spezifischen Primern und beschreibt zwei positive Proben (4,9%) (Ike et al., 2007). Die Unterschiede in der Prävalenz können auf die Verwendung unterschiedlicher Testsysteme zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung wäre die Untersuchung unterschiedlicher Kohorten, in denen verschiedene Prävalenzen vorliegen.

Die nachgewiesenen bovinen Noroviren (Tab. 22) stammen von 32 Rindern aus 19 unterschiedlichen Betrieben in acht Landkreisen Hessens sowie je einem Landkreis in Rheinland-Pfalz, Schleswig-Holstein und Sachsen-Anhalt. Mit der Ausnahme von zwei Tieren litten alle zum Zeitpunkt der Probennahme an Diarrhöe; diese Tiere stammten allerdings aus einem Bestand, in dem eine Problematik mit Kälberdiarrhöe vorlag und aus dem zwei weitere Tiere mit Durchfall positiv auf Noroviren getestet wurden.

Die Einträge der bei der Probenentnahme ausgefüllten Fragebögen sowie der im Rahmen der Routinediagnostik eingesandten Untersuchungsanträge wurden statistisch im Hinblick auf die Ergebnisse der RT-PCR untersucht. Dazu mussten zunächst die im Rahmen der Fragebogenaktion gesammelten Proben von den eingesandten diagnostischen Proben getrennt werden, da die bewusst im Rahmen der Fragebogenaktion gesammelten Proben nicht mit den zufällig eingesandten Proben gemeinsam analysiert werden konnten. Zu der Gruppe der eingesandten Rinderproben gehörten 463 Proben, in denen in 26 Fällen

Norovirus-RNS detektiert wurde (5,6%). Die Gruppe „Fragebogenaktion“ umfasste 83 Rinder, von denen 7,2% positiv getestet wurden (sechs Tiere). Statistisch signifikant war in beiden Gruppen der Einfluß des Alters: Zum Zeitpunkt der Probennahme Norovirus-positive Tiere waren statistisch signifikant jünger als die negativ getesteten Tiere. Dies entspricht der Situation bei neonatalen Rota- und Coronavirus-assoziierten Diarrhöen: Rotavirus-Diarrhöen treten hauptsächlich bei Jungtieren im Alter von einer bis acht Wochen auf, wobei Tiere in der ersten Lebenswoche selten betroffen sind (Murphy et al., 1999b); Coronaviren werden am häufigsten im Kot von einer Woche alten Kälbern mit Diarrhöe nachgewiesen (Murphy et al., 1999a). In der Gruppe der Fragebogenaktion war zudem die Jahreszeit ausschlaggebend: Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte zwischen dem Vorkommen einer Norovirusinfektion und den Jahreszeiten Herbst und Winter ermittelt werden. Dies entspricht dem klassischen Auftreten von Norovirusinfektionen beim Menschen; auch dort ist besonders in den Wintermonaten mit dem Vorkommen von Norovirusinfektionen zu rechnen (Mounts et al., 2000), was der bereits 1969 geprägte Begriff „winter vomiting disease“ widerspiegelt (Adler und Zickl, 1969). Eine weitere Analogie ist hier zu den bovinen enteralen Coronaviren zu sehen: Die Winterdysenterie, die sporadisch bei adulten Rindern weltweit auftritt und unter anderem durch bovine Coronaviren verursacht wird, tritt, wie der Name sagt, hauptsächlich in den Wintermonaten auf (Murphy et al., 1999a). Für Noroviren wurde in England zusätzlich zu einer Häufung in den Wintermonaten eine Zunahme der Erkrankungsfälle in den Sommermonaten beobachtet (Lopman et al., 2003).

Des Weiteren konnten die Parameter Betriebsform (Zucht- und Milchviehhaltung) sowie die Bestandsprobleme Atemwegserkrankungen und Todesfälle verschiedener Genese im Bestand als statistisch signifikant im Zusammenhang mit einem positiven Norovirusnachweis beurteilt werden. Diese Befunde stehen in keinem Zusammenhang mit bisher gemachten Beobachtungen aus der Literatur. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Parameter nur durch zufällige Beobachtungen einen Zusammenhang zeigen, jedoch eine andere Ursache haben. Möglich ist jedoch auch, dass die beschriebenen Bestandsprobleme Infektionen mit Noroviren bei den Tieren begünstigen, indem diese Bestandsprobleme das Immunsystem der betroffenen Tiere schwächen und diese so anfälliger für eine Norovirusinfektion sind.

Ein Grund für die geringe Zahl statistisch signifikanter Zusammenhänge ist in der niedrigen Prävalenz der detektierten Noro- und auch der Sapoviren zu suchen, wodurch der statistischen Analyse niedrige Erwartungswerte zu Grunde liegen. Erstaunlich ist, dass insbesondere zu dem Symptom Diarrhöe beim Einzeltier (Rind) und dem Bestandsproblem Diarrhöe (Rind) kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden konnte. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass fast alle Tiere Diarrhöe zeigten und auch die Mehrzahl der

Bestände Probleme mit Diarrhöe hatten. Dadurch hätten die Norovirus-Prävalenzen wesentlich höher sein müssen, um statistisch signifikante Zusammenhänge zu detektieren. Auch die beiden positiv getesteten Rinder, die aus einem Problembestand stammten, dass Symptom Diarrhöe jedoch nicht zeigten, verschoben den Parameter, da sie als Nicht-Merkmalsträger in der Statistik geführt wurden. Des Weiteren führten fehlende Angaben auf Fragebögen und Untersuchungsanträgen zu unvollständigen Datensätzen, was die statistische Auswertung ebenfalls erschwerte. Die Rohdaten, die der statistischen Auswertung zugrunde lagen, sind tabellarisch im Anhang (Kapitel 9.1) aufgeführt.

Porzine Noroviren konnten in keiner der 132 Kot- und Organproben von Schweinen detektiert werden. Auch hier wurde das breit reagierende Primerpaar JV12Y/13I verwendet. Weiterhin konnte in 32 Kotproben von kleinen Wiederkäuern (Schafen und Ziegen) sowie in Kotproben anderer Spezies keine virusspezifische RNS gefunden werden – diese Spezies sind bislang noch nicht als empfänglich für Noroviren beschrieben worden. Die ermittelten Ergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass kleine Wiederkäuer nicht zum Wirtsspektrum von Noroviren gehören.

5.3 Nachweis von Sapoviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Der Nachweis von Sapovirus-RNS mit Hilfe der RT-PCR gelang bei acht von 132 Kot- und Organproben von Schweinen (6,1%). In den bisher durchgeführten Studien zur Prävalenz porziner Sapoviren variieren die Werte zwischen 0% und 37,5% (Tab. 3) (Lyman et al., 2004; Wang et al., 2005b; Kim et al., 2006; Martinez et al., 2006; Yin et al., 2006). Aus Europa liegt bisher nur eine Studie aus Ungarn vor, in der porzine enterale Sapoviren in 11,7% der Proben (17 Tiere) unter Verwendung eines Primerpaares, das sowohl Sapo- als auch Noroviren detektiert, nachgewiesen werden konnten (Reuter et al., 2007). In einer Studie aus Korea an 60 gesunden Schweinen konnten keine porzinen Sapoviren detektiert werden (Kim et al., 2006).

Insgesamt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in insgesamt acht Kotproben von Schweinen Sapovirus RNS detektiert werden: Bei sieben der Sapovirus-positiven Proben gelang die Amplifikation eines 320 Bp großen PCR-Produktes aus dem Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase, bei sieben Tieren eines 385 Bp großen PCR-Fragmentes aus dem Bereich des Kapsidgens. Sechs Proben waren in beiden Testverfahren positiv.

Aus einer Kotprobe konnte kein Fragment für den Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase generiert werden, für eine Probe kein Fragment für den Bereich des Kapsidgens. Der Grund hierfür könnte folgender sein: Es stehen als Untersuchungsmaterial nur Kotproben zur Verfügung, die eine hohe Zahl möglicher Kontaminanten und Inhibitoren

beinhalten. Da es sich um RNS-Viren handelt, ist das Genom besonders empfindlich, da es durch ubiquitäre RNasen abgebaut wird.

Das spezielle Zellkultursystem für porcine Sapoviren steht aufgrund seiner Komplexität nur einigen Forschungseinrichtungen zur Verfügung und kann bislang ohne Einschränkung nur für den zellkulturadaptierten PEC-Cowden Stamm angewendet werden (Chang et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit bestand daher keine Möglichkeit zur Virusanzucht aus den Proben. Die Heterogenität der porcinen Sapoviren erschwert die Untersuchung der Proben für das Kapsidgen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für das VP1 sind spezifisch für porcine Sapoviren der Genogruppe III. Eine Amplifikation mit Hilfe Genogruppe VI-spezifischer Primer war bislang nicht erfolgreich. Eine Untersuchung der Kotprobe KP020Schw. mit für die RNS-abhängige RNS-Polymerase (RdRp) der Genogruppe VI-spezifischen Primern gelang nicht (Daten nicht gezeigt).

Eine Auflistung der positiv getesteten Proben von Schweinen zeigt Tab. 28. Die acht Schweine, in deren Kot Sapovirus-RNS detektiert werden konnte, stammten aus vier unterschiedlichen Betrieben aus Deutschland sowie den Niederlanden. Die betroffenen Tiere waren zwei bis vier Wochen alt, drei Tiere litten zum Zeitpunkt der Probennahme an Diarrhöe, drei Tiere waren klinisch gesund. Der Nachweis von Sapovirus-RNS auch aus dem Kot klinisch gesunder Tiere unterstützt die Ergebnisse von Wang (Wang et al., 2005a). Die Einträge der bei der Probennahme ausgefüllten Fragebögen wurden analog zu der statistischen Auswertung bei den Noroviren auf Zusammenhänge im Hinblick auf die Ergebnisse der RT-PCR untersucht. Auch beim Nachweis porciner enteraler Sapoviren zeigte das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Beprobung einen signifikanten Einfluss: Sapovirus-positive Tiere waren signifikant jünger als die Tiere, in deren Kotproben keine Sapovirus-RNS detektiert wurde. Zusätzlich war die Symptomgruppe Haut und Hautanhangsorgane auffällig. Bei den positiven Tieren dieser Gruppe handelt es sich um ein Tier mit Panaritium und eines mit einem Nabelabszess. Der signifikante Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Symptomgruppe und dem positiven Sapovirusnachweis im Kot lässt auf eine Begünstigung einer Norovirusinfektion durch diese Symptomgruppe oder auch umgekehrt schließen. Nicht auszuschließen ist ein zufälliger Zusammenhang – inwieweit die ermittelte Signifikanz in der Praxis eine Rolle spielt, lässt sich nur durch weitere Untersuchungen belegen. Weitere signifikante Parameter konnten nicht ermittelt werden. Auch hier wurde die statistische Auswertung durch fehlende Parameter in den Fragebögen erschwert.

Zusätzlich wurden 202 Proben von Rindern, 32 Proben von kleinen Wiederkäuern und 20 Proben von Tieren anderer Spezies mit negativem Ergebnis auf das Vorhandensein von

Sapovirus-spezifischer RNS untersucht. Bisher waren Sapoviren nur bei Mensch, Schwein und Nerz bekannt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen die Annahme, dass Sapoviren auf diese drei Wirtsspezies beschränkt sind. Dennoch sollten andere Spezies weiterhin getestet werden, da das Vorkommen von Sapoviren nicht ausgeschlossen werden kann.

5.4 Phylogenetische Analysen der detektierten Noro- und Sapovirusisolate

Ein wichtiges Kriterium zur Einteilung von Noro- und Sapoviren ist ihre genetische Verwandtschaft, die sich anhand phylogenetischer Analysen ermitteln lässt. Diese Analysen können auf der Basis der vollständigen Nukleinsäuresequenzen (komplette Virusgenome) oder von Teilsequenzen bestimmter Genombereiche erstellt werden. Da die Bestimmung kompletter Virusgenome mit hohem Aufwand und hohen Kosten verbunden ist, werden meist kleinere Sequenzabschnitte verwendet. Die phylogenetischen Analysen umfassen bei Noro- und auch bei Sapoviren in der Mehrzahl der Fälle die Bereiche der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RdRp) sowie des Kapsidgens (VP1). Aus diesen Bereichen liegen somit auch in der Genbank die meisten Sequenzen vor, die zum Vergleich der ermittelten Sequenzen herangezogen wurden.

Phylogenetische Analysen der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Noro- und Sapovirusisolate wurden auf der Basis von Nukleinsäureteilsequenzen der RNS-abhängigen RNS-Polymerase und des Kapsidgens unter Berücksichtigung von in der Genbank publizierten Sequenzen durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen ließen sich aufgrund der genetischen Distanzen, die mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode (Kimura, 1980) berechnet wurden, sowie durch die Topologie der mit der Neighbor-joining Methode (Saitou und Nei, 1987) erstellten phylogenetischen Bäume den einzelnen Genogruppen sowie Genotypen zuordnen.

5.4.1 Norovirus

Das Genus *Norovirus* wird nach der Nomenklatur des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) weiter klassifiziert in die Spezies Norwalk Virus (Fauquet et al., 2005). Diese lässt sich auf der Basis von Sequenzanalysen aus konservierten Bereichen der RNS-abhängigen RNS-Polymerase oder des Kapsidgens in fünf Genogruppen unterteilen, die ihrerseits in Genotypen unterteilt werden (Zheng et al., 2006). Während in den Genogruppen I und IV nur humane Isolate vertreten sind, beinhaltet die Genogruppe II neben humanen Noroviren auch porcine Isolate (Wang et al., 2005a). Genogruppe V umfasst die murinen Noroviren. Die bislang bekannten bovinen Noroviren finden sich separat von humanen und porcinen Noroviren in Genogruppe III.

Für die Klassifikation in Genogruppen und Genotypen wurde bislang keine allgemeine Übereinkunft gefunden. Somit gibt es kein einheitliches Klassifikationsschema. Für die in dieser Arbeit verwendeten phylogenetischen Analysen der Norovirusisolate wurde die von Zheng beschriebene Klassifikation angewandt, die von den meisten Autoren unterstützt wird (Smiley et al., 2003; Han et al., 2005; Oliver et al., 2006a).

Alle in dieser Arbeit analysierten Norovirusisolate von Rindern konnten zusammen mit den bekannten bovinen Isolaten in die Genogruppe III des Genus *Norovirus* eingeordnet werden. Die Genogruppe III des Genus *Norovirus* lässt sich in zwei getrennte Cluster unterteilen: Das Cluster GGIII/1 beinhaltet das in Deutschland gefundene Jena Virus, das Cluster GGIII/2 das in Großbritannien isolierte Newbury agent-2 (Han et al., 2004). Interessanterweise konnten alle in Giessen gefundenen Isolate dem Cluster GGIII/2 zugeordnet werden. Auch die fünf Isolate, von denen ein Teil des für das Kapsidprotein kodierenden Genombereichs amplifiziert und analysiert wurde, gruppieren zusammen mit anderen bovinen Vertretern in Genogruppe III, Cluster 2. In den in Kapitel 4.1.2 gezeigten phylogenetischen Bäumen von Vertretern des Genus *Norovirus*, die durch Sequenzvergleiche auf der Basis von 250 Basen aus dem für die RdRp (Abb. 12, Abb. 13) bzw. 739 Basen aus dem für das Kapsid (Abb. 14) kodierenden Genombereich erstellt wurden, ist diese Eingruppierung in Genogruppe III/2 deutlich erkennbar. Auch Smiley et. al. vermuten, dass GGIII/1 zu einem Cluster geringerer Bedeutung gehört (Smiley et al., 2003). Die Ergebnisse anderer Studien lassen auch erkennen, dass die Mehrzahl der Isolate aus Rindern in GGIII/2 eingeordnet werden kann (Oliver et al., 2003; Smiley et al., 2003; Wise et al., 2004).

Diese Vermutung steht im Gegensatz zu der im Jahr 2003 veröffentlichten Studie von Deng et. al., die mit einem ELISA-Testsystem auf der Basis von VLPs des rekombinanten Jena Virus durchgeführt wurde. In dieser Untersuchung wurden 381 Kotproben von Rindern aus Thüringen, Hessen und Bayern mit Hilfe eines Antigen-ELISA getestet, von denen 34 Proben positiv waren (8,9%). In der selben Studie wurden 824 Serum- und Plasmaproben aus Thüringen untersucht. Dabei zeigten 99,1% eine positive Reaktion im Antikörper-ELISA (Deng et al., 2003). Die beiden im Rahmen der Studie von Ike et. al. analysierten Isolate aus Baden-Württemberg zeigten jedoch die auch in der vorliegenden Arbeit gefundene Einordnung in Genogruppe III/2 (Ike et al., 2007). Die bovinen Noroviren Jena und Newbury agent-2 gehören zu zwei verschiedenen antigenetischen Typen, besitzen allerdings mindestens ein kreuzreaktives Epitop im N-terminalen Bereich (Oliver et al., 2006b). Dennoch ist eine so hohe Prävalenz allein durch Kreuzreaktion nicht zu erklären, da die Antikörper primär gegen den C-terminalen Bereich gerichtet sind (Hardy et al., 1996) und somit im VLP-ELISA leichter zugänglich sind.

5.4.2 Sapovirus

Das Genus Sapovirus enthält nach der Nomenklatur der ICTV nur eine Spezies, Sapporo Virus (Fauquet et al., 2005). Auch hier erfolgt in der Fachliteratur eine weitere Unterteilung in Genogruppen und Genotypen (Farkas et al., 2004). Die Genogruppen I, II, IV und V umfassen humane Sapoviren, Genogruppe VII das enterale Sapovirus der Nerze. Die porzinen enteralen Sapoviren finden sich in den Genogruppen III und VI (Wang et al., 2005b).

Von sieben der acht im Rahmen dieser Arbeit detektierten Sapovirusisolate wurde ein 228 Basen großer Abschnitt des für die RdRp kodierenden Genombereiches analysiert. Der Vergleich der Sequenzen der in Giessen gefundenen Isolate mit in der Genbank erhältlichen Sequenzen zeigte eine Verwandtschaft mit bekannten porzinen enteralen Sapoviren (Abb. 27). Fünf Isolate (Po/Sav/Giessen-01 bis -05) konnten zum PEC Cowden Stamm in Genogruppe III eingeordnet werden; zwei Isolate (Po/Sav/Giessen-06 und -07) in Genogruppe VI, die erst kürzlich entdeckte porcine enterale Sapoviren enthält (Wang et al., 2005b). Die beiden in Giessen gefundenen Isolate sind im phylogenetischen Baum als Giessen-06A und 07A (*) gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu konnten alle sieben für einen Teilbereich des VP1 (351 Basen) positiven Isolate in Genogruppe III eingeordnet werden, darunter interessanterweise auch die Isolate Po/SaV/Giessen-06 und -07 (Abb. 28), welche für den Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase in die neue Genogruppe VI eingeordnet werden können (Abb. 27). Hierbei wurden PEC Cowden-spezifische Primer verwendet, die Vertreter der Genogruppe VI nicht detektieren können. Um zu ermitteln, ob es sich bei den Isolaten Giessen-06 und Giessen-07 um rekombinante Viren handelt, wurde mit den Primern SR80(+) und PEC02R der Übergangsbereich zwischen Polymerasegen und Kapsidgen sequenziert. Dabei ergab sich in beiden Fällen eine den Isolaten der Genogruppe III ähnliche Sequenz. Die korrespondierenden RdRp-Sequenzen sind im Baum als Po/SaV/Giessen-06B und 07B gekennzeichnet (*). Eine Amplifikation des Übergangsbereiches mit Hilfe Genogruppe VI-spezifischer Primer war bislang nicht erfolgreich; dies könnte klären, ob es sich je um eine Doppelinfektion mit zwei verschiedenen Viren (eines der Genogruppe III, eines der Genogruppe VI) oder um ein Virus der Genogruppe III und ein rekombinantes Virus (GGIII/VI) handelt. Des weiteren wäre eine Kontamination möglich, jedoch sehr unwahrscheinlich, da die beiden Viren einander sehr unähnlich sind und mit den Viren dieser Genogruppe in unserem Institut bislang nicht gearbeitet wurde.

5.4.3 Statistische Zuverlässigkeit der phylogenetischen Bäume

Zur statistischen Absicherung der erhaltenen Gruppierungen wurden Bootstrap-Analysen jeweils anhand 1.000 replikativer Datensätze durchgeführt. Die Bootstrap-Analyse ist ein interferenzstatistisches Verfahren, das von Felsenstein in phylogenetische Studien eingeführt wurde (Felsenstein, 1985, 1988). Der Bootstrap nimmt an, dass die Punkte unabhängig und gleich verteilt sind. Die Bootstrap-Analyse rekonstruiert die Verteilung direkt aus einer Stichprobe, indem viele Stichproben aus der untersuchten Gesamtheit „mit Zurücklegen“ gezogen werden und zeigt so die Zuverlässigkeit einzelner Cluster phylogenetischer Bäume an. Je näher der Bootstrap-Wert im Falle von 1000 Replikaten an 1000 liegt, desto höher ist die Unterstützung der Gruppierungen. Verzweigungen mit Bootstrap-Werten über 95% (hier: 950) werden im Allgemeinen als statistisch signifikante Verzweigungen angesehen.

Die Bootstrap-Werte der in der vorliegenden Arbeit erstellten phylogenetischen Bäume sind in vielen Fällen relativ gering. Wegen der großen Heterogenität der Caliciviren ist dies nicht verwunderlich. Nur wenige Verzweigungen werden durch hohe Bootstrapwerte unterstützt. Einige der Untersuchungen zeigen beispielsweise geringe Bootstrapwerte (396 und 381) (Abb. 1) für die Einordnung der Genogruppe VI des Genus *Sapovirus* an die entsprechende Lokalisation des phylogenetischen Baumes.

5.4.4 Genetische Distanzen der für die phylogenetischen Bäume verwendeten Isolate

Außer über die Topologie der phylogenetischen Bäume kann eine Einordnung von Isolaten auch anhand der genetischen Distanzen bzw. Homologien in Genera, Genogruppen und Genotypen erfolgen. Dazu werden durch paarweise Vergleiche der einzelnen Sequenzen zueinander Distanz- bzw. Homologiematrices errechnet. In der vorliegenden Arbeit wurden die im Rahmen der Erstellung der phylogenetischen Bäume errechneten Distanzmatrices, die mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet wurden, als Grundlage verwendet. Die erhaltenen Werte wurden in repräsentative Klassen eingeteilt und eine Häufigkeitsverteilung erstellt.

Eine eindeutige Trennung der Genogruppen konnte sowohl für Noroviren als auch für Sapoviren nur für den untersuchten Bereich des Kapsidgens gezeigt werden (Abb. 15 B und Abb. 29 B). Hier lagen für das Genus *Norovirus* die Distanzen innerhalb der Genogruppen bei 0 bis 31,15 Austauschen pro 100 Basen, zwischen den Genogruppen hingegen bei 33,56 bis 48,19 Austauschen pro 100 Basen. Für das Genus *Sapovirus* lagen die Distanzen innerhalb der Genogruppen bei 0 bis 30,48 Austauschen pro 100 Basen, zwischen den Genogruppen hingegen bei 33,62 bis 57,26 Austauschen pro 100 Basen. Das

Verteilungsmuster der Häufigkeiten mit zwei deutlichen Maxima unterstützte diese Unterteilung.

Für den Bereich der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (Abb. 15 A und Abb. 29 A) hingegen konnte sowohl für das Genus *Norovirus* als auch für das Genus *Sapovirus* keine klare Trennung der Distanzen innerhalb bzw. zwischen den Genogruppen errechnet werden. Obwohl diese Region den am höchsten konservierten Bereich des Genoms innerhalb der Genera der Familie *Caliciviridae* darstellt, besteht hier dennoch eine hohe Sequenz-Diversität (Vinje et al., 2000b). Für das Genus *Sapovirus* umfasste der Distanzbereich, der sowohl für die Distanzen innerhalb der Genogruppen als auch zwischen den Genogruppen errechnet werden konnte, Distanzen zwischen 30,26 und 47,37 Austauschen pro 100 Basen. Eine Auftrennung der neuen Genogruppe VI in zwei Genogruppen reduzierte die Distanzen auf 30,26 bis 34,65 Austausche pro 100 Basen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, die etablierte Genogruppe VI des Genus *Sapovirus* stattdessen als zwei getrennte Genogruppen innerhalb des Genus *Sapovirus* zu behandeln. Die in dieser Arbeit für den untersuchten Bereich des Kapsidgens durchgeführten Distanzuntersuchungen schlossen die Genogruppe VI nicht ein, da hier nur ein Isolat verwendet wurde. Weitere Untersuchungen, insbesondere für den Bereich des Kapsidgens, werden nötig sein, um eine genauere Einordnung der betroffenen Isolate zu ermöglichen.

5.4.5 Rekombination

Rekombinationen kommen bei Noro- und Sapoviren häufig vor, wobei die Rekombination in der Regel zwischen Vertretern einer Genogruppe auftritt. Der Ort der Rekombination liegt meist zwischen Polymerase und Kapsid (Katayama et al., 2004; Ambert-Balay et al., 2005). Innerhalb der Genogruppe III der Noroviren (bovine Noroviren) konnten bereits Rekombinanten zwischen Genotyp 1 (Jena Virus) und 2 (Newbury-agent 2) nachgewiesen werden (Han et al., 2004; Oliver et al., 2004). Die Möglichkeit zur Entstehung von Rekombinanten zwischen humanen und porcinen Vertretern in Genogruppe II der Noroviren, in die neben der Mehrzahl humaner Vertreter auch die porcinen Noroviren eingeordnet werden, kann nicht ausgeschlossen werden (Wang et al., 2005a). Eine Doppelinfektion eines Menschen oder Schweines mit einem porcinen und einem humanen Isolat könnte zur Rekombination und zur Entstehung speziesübergreifender Erreger führen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch keine porcinen Noroviren isoliert werden.

Für fünf der insgesamt 32 Norovirusisolate wurde zusätzlich zu einem Teil des für die Polymerase kodierenden Genomabschnittes auch ein Teil des 5'-Endes des für das VP1 kodierenden Genomabschnittes amplifiziert und analysiert. Alle Isolate konnten auch in diesem Bereich der Genogruppe III zugeordnet werden. Bislang konnte für das Genus

Norovirus keine Rekombination zwischen Vertretern verschiedener Genogruppen gezeigt werden.

Für die in Giessen entdeckten Sapovirusisolate konnten in fünf Fällen sowohl ein Teil des für die Polymerase kodierenden Genombereichs als auch des für das VP1 kodierenden Genombereichs amplifiziert und anschließend analysiert werden. Rekombinationen innerhalb der Genogruppe III der Sapoviren traten nach Meinung einiger Autoren bereits auf (Wang et al., 2005b), hier erfolgte jedoch bislang keine weitere Unterteilung in Genotypen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei mögliche rekombinante Virusisolate detektiert werden: Die Isolate KP004Schw. und KP071Schw. (Po/SaV/Giessen-06 und -07) zeigten für 228 Basen des für die Polymerase kodierenden Bereichs eine Einordnung in Genogruppe VI, für 351 Basen des für das VP1 kodierenden Bereichs jedoch eine Eingruppierung in Genogruppe III des Genus *Sapovirus*. Es kann sich daher um Rekombinanten zwischen Vertretern aus Genogruppe III und VI des Genus *Sapovirus* handeln. Wie bereits zuvor beschrieben wurde, war die Amplifikation einer mutmaßlichen Rekombinationsstelle bislang nicht erfolgreich.

5.5 Produktion virusähnlicher Partikel (VLPs) und deren Einsatz für die Diagnostik

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bildete die Produktion virusähnlicher Partikel (VLPs). Sie sollten in erster Linie der Etablierung von ELISA-Systemen zur Bestimmung der Seroprävalenz von Antikörpern gegen bovine Noroviren und porcine Sapoviren dienen.

Das Kapsidprotein VP1 der Caliciviren besitzt die Eigenschaft, nach Expression in heterologen Systemen selbsttätig zu VLPs zu aggregieren. Diese sind den nativen Virionen morphologisch und antigenetisch sehr ähnlich und können daher als Antigen in verschiedenen Testverfahren verwendet werden. Die Produktion der VLPs erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Baculovirusexpressionssystems.

Zunächst wurde versucht, Baculoviren, die das Kapsidprotein VP1 des porcinen enteralen Sapovirus Stamm Cowden exprimieren (von Prof. Saif, Wooster, Ohio zur Verfügung gestellt) zu vermehren und daraus rPEC-VLPs zu reinigen. Zwar konnten einzelne VLPs elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Abb. 36 B), die Menge des gewünschten Proteins war jedoch nicht befriedigend. Als Ursache wurde ein Zerfall der VLPs aufgrund von Instabilität vermutet. Für weitere Analysen stand kein spezifischer Antikörper gegen das VP1 zur Verfügung. Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse wurden neue rekombinante Baculoviren generiert und hierfür ein neuer Ansatz gewählt. Es ist bekannt, dass die Co-Expression des Kapsidproteins VP1 und des kleinen basischen Strukturproteins VP2 im Vergleich zu einer alleinigen Expression des VP1 eine Erhöhung der Stabilität von Norovirus-

VLPs bewirkt, da sie diese vor dem Verdau durch Proteasen schützt (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Daher wurden eigene Konstrukte entwickelt, die die kodierende Sequenz sowohl von VP1 als auch von VP2 beinhalten. Ausgangsprodukt dafür waren positive Kotproben eines Rindes (KP330Rd.) bzw. eines Schweines (KP070Schw.). Aus beiden Proben wurde sowohl ein Teil des für die RdRp als auch des für das komplette VP1 und VP2 kodierenden Genomabschnittes sequenziert und analysiert. Die Verwendung des Baculovirusexpressionsvektors pBlueBacHis2A® (Fa. Invitrogen) bot zudem den Vorteil, dass durch Anhängen einer 6 x Histidinsequenz am N-Terminus das exprimierte Protein leicht detektiert werden konnte.

Die Expression des Kapsidproteins VP1 sowohl für das bovine Norovirus (r18161) als auch für das porcine enterale Sapovirus (rM25) konnte anhand von Sequenzierung (Daten nicht gezeigt), der PCR, durch Analyse im Immunoblot sowie in der Coomassie-Färbung der Proteine nach SDS-PAGE gezeigt werden (Kapitel 4.3.2). Da das Strukturprotein VP2 ohne heterologe Erkennungssequenz exprimiert wird, konnte der Beweis einer Co-Expression nicht geführt werden. Das VP2 von Norwalk Virus besitzt multiple molekulare Massen von 23 kDa und 35 kDa (Glass et al., 2000a); die Coomassie-Färbungen zeigten jedoch keine Banden in dieser Größe.

Der Mechanismus der Expression des VP2 in vivo und in vitro ist nicht geklärt. Vermutlich handelt es sich um einen Terminations-Reinitiations-Mechanismus, durch den VP2 von bicistronischer RNS translatiert wird (Meyers, 2003). Inwieweit tatsächlich eine Co-Expression in dem in dieser Arbeit verwendeten System stattgefunden hat, ließe sich anhand spezifischer Antiseren testen, die bisher nicht verfügbar sind.

Die vergleichsweise schwache Expression des VP1 von porcinen enteralen Sapoviren (rM25) war möglicherweise auf eine zu niedrige MOI zurückzuführen. Da der Titer der Stockvirussuspension nicht erheblich erhöht werden konnte, wurde die Infektion nur mit einer MOI von 3 durchgeführt. Auch kann, da der Nachweis des VP2 nicht möglich war, nicht ausgeschlossen werden, dass dieses mit dem gewählten System nicht exprimiert wurde und somit nicht zur Stabilisierung der VLPs beitragen konnte.

Für r18161 gelang zudem der elektronenmikroskopische Nachweis der VLPs (Abb. 46). Hierbei fiel auf, dass die Größe der VLPs sehr heterogen war: Neben der für Noroviren charakteristischen Größe von etwa 35 nm waren auch Partikel mit einer Größe von nur etwa 20 nm zu finden. Diese Beobachtung ist analog zu der von Hansman und basiert möglicherweise auf einer 5'-terminalen Deletion einzelner Sequenzen, für die ein Einfluss auf den Durchmesser der Partikel bislang allerdings nur für Sapoviren gezeigt wurde

(Hansman et al., 2005a; Hansman et al., 2007). Auch andere Autoren beschrieben kleinere Partikel: White et. al. fanden VLPs mit einem 23 nm großen Durchmesser und vermuten, dass diese aus nur 60 Dimeren des VP1 resultieren, die in einer $T = 1$ Symmetrie zusammengebaut sind (White et al., 1997). Des Weiteren wurden etwa 5 nm große Strukturen beschrieben, die ebenfalls für r18161 visualisiert werden konnten. Diese stellen sogenannte „P-Partikel“ dar, die aus 12 Dimeren der P-Domäne des VP1 (Abb. 3) zusammengebaut werden (Tan und Jiang, 2005a). Auch Calicivirus-ähnliche Strukturen größeren Durchmessers konnten gefunden werden. Von Bertolotti-Ciarlet et. al. wurden bereits 45 nm große Partikel beschrieben, die aufgrund interner Deletionen in der P-Domäne verursacht wurden (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002).

Mit den exprimierten bovinen Norovirus-VLPs sowie den porcinen enteralen Sapovirus-VLPs stehen Reagenzien zur Verfügung, die die Durchführung zukünftiger Versuche zur Etablierung und Optimierung von ELISA-Systemen ermöglichen. Mit diesen können Studien zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen Noro- und Sapoviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren durchgeführt werden. Bislang liegen nur wenige Studien zur Seroprävalenz dieser Viren bei landwirtschaftlichen Nutztieren vor (Tab. 2). Antikörper gegen bovine Noroviren konnten in einer Studie aus Deutschland in 99,1% von 824 Rindern detektiert werden (Deng et al., 2003). In einer weiteren wurden in 36% der Serumproben von 266 Schweinen aus Japan und 71% der Serumproben von 110 Schweinen aus den USA Antikörper gegen porcine Noroviren detektiert (Farkas et al., 2005). In der selben Studie wurden andererseits bei Schweinen Antikörper gegen humane Noroviren gefunden (Farkas et al., 2005). Kreuzreaktionen konnten dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen porcine enterale Sapoviren liegen bisher nicht vor.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, humane Serumproben auf Antikörper gegen bovine Noroviren und porcine enterale Sapoviren zu testen. Antikörper gegen bovine Noroviren wurden bereits von Widdowson in humanen Serumproben von Tierärzten und Nicht-Tierärzten in den Niederlanden detektiert (Widdowson et al., 2005). In der Gruppe der Tierärzte lag der Anteil positiver Reagenten bei 28%, in der Gruppe der Nicht-Tierärzte nur bei 20%. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bovine Noroviren Menschen infizieren können, wenn auch seltener als humane Stämme. Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen bovine Noroviren und Norwalk Virus konnte zwar beobachtet werden, aber 20% aller positiven Proben zeigten eine höhere Reaktivität zu bovinen Noroviren als zu Norwalk Virus, was darauf hindeutet, dass eine Infektion mit bovinen Noroviren vorlag. Bislang wurde keine Studie veröffentlicht, in der humane Serumproben auf Antikörper gegen porcine enterale Sapoviren untersucht wurden.

5.6 Bedeutung animaler Noro- und Sapoviren als Infektionserreger für landwirtschaftliche Nutztiere

Bovine Noroviren und porcine enterale Sapoviren wurden bereits in den 1970er und 1980er Jahren aus dem Kot von Tieren isoliert, die an Diarrhöe erkrankt waren (Woode und Bridger, 1978; Saif et al., 1980; Günther und Otto, 1987). Seit dieser Zeit wurden verschiedene Studien zur Pathogenese u.a. im Tierversuch durchgeführt. Dabei konnte sowohl an kolostrumfrei aufgezogenen als auch an gnotobiotischen Kälbern gezeigt werden, dass Noroviren allein eine Diarrhöe hervorrufen können (Woode und Bridger, 1978; Liu et al., 1999). Analoge Studien mit porcinen enteralen Sapoviren an gnotobiotischen Schweinen zeigten die Induktion von Diarrhöe und intestinalen Schäden (Flynn et al., 1988).

In der vorliegenden Arbeit bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Detektion von Noro- und Sapoviren und dem Vorliegen einer Diarrhöe. Es ist jedoch auffällig, dass besonders im Fall des Norovirusnachweises ein Zusammenhang mit einer Durchfallerkrankung stets anamnestisch festgestellt werden konnte: 30 der 32 positiven Tiere litten zum Zeitpunkt der Probenentnahme an Diarrhöe, die übrigen zwei Tiere stammten aus einem Bestand, in dem Probleme mit Diarrhöe vorlagen und zwei weitere Tiere positiv getestet wurden. Somit besitzen bovine Noroviren auch Bezug nehmend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Relevanz als Krankheitserreger für Kälber. Noroviren scheinen wichtige Durchfallerreger zu sein, die in das diagnostische Vorgehen einbezogen werden sollten. In acht der Norovirus-positiven Proben, die elektronenmikroskopisch untersucht wurden, konnten elektronenmikroskopisch Rotaviren detektiert werden. Das gleichzeitige Vorliegen einer Norovirus- und einer Rotavirusinfektion war jedoch mit einem p-Wert von 0,053 knapp nicht signifikant.

Im Laufe der Arbeit stellte sich die Frage nach der Notwendigkeit einer Vakzine zum Schutz vor einer Noroviruserkrankung bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Vakzinen für den Menschen werden derzeit getestet: Die bisher in der Entwicklung befindlichen Impfstoffe basieren auf VLPs, die im Baculovirussystem (Estes et al., 1997), aber auch in Pflanzen wie z.B. Kartoffeln (Tacket, 2005), Tomaten (Huang et al., 2005) oder Tabak exprimiert werden können (Mason et al., 1996). Erste Versuche an Freiwilligen und Tierexperimente weisen bereits Erfolge auf: Kälber zeigten in Challenge-Versuchen nach Impfung mit VLPs einen partiellen Schutz mit verzögerter und verkürzter Diarrhöe (Han et al., 2006). Klinische Phase-I-Studien mit oral verabreichten rekombinanten Norwalk VLPs am Menschen haben gezeigt, dass die Betroffenen nach Challenge sowohl Serum-IgG als auch Serum-IgA Antikörpertiter ausbilden (Ball et al., 1999). Das allgemeine Problem ist jedoch die Heterogenität der Erreger: Als „Impfstamm“ beim Menschen würde sich zunächst sicherlich ein Vertreter der

Genogruppe II/4 anbieten, die zur Mehrzahl der Erkrankungen führt. Bei Rindern wäre die Verwendung eines Isolates aus der Genogruppe III/2 anzuraten, da hier die meisten Feldisolate gefunden wurden. Es ist denkbar, die bestehenden Muttertiervakzinen gegen Rota- und Coronaviren um den Faktor der Noroviren zu ergänzen.

Porzine Noroviren wurden bisher nur aus dem Kot klinisch gesunder Tiere isoliert und spielen als Krankheitserreger vermutlich nur eine geringe Rolle. Auch in der vorliegenden Studie konnten keine porcinen Noroviren detektiert werden. Porzine enterale Sapoviren finden sich häufig in Kotproben symptomloser Schweine. Ihre Relevanz als Durchfallerreger wird daher als eher gering eingeschätzt. Dennoch sollten auch Kotproben von Schweinen, die an Diarrhöe leiden, routinemäßig auf das Vorliegen einer Infektion mit Noro- oder Sapoviren untersucht werden. Gerade das Vorkommen einer hohen Rate subklinisch infizierter adulter Schweine ist nach Wang et al. von großer Bedeutung für die Persistenz dieser Viren in der Natur und stellt ein Risiko für die Entstehung neuer Stämme dar, die auch auf den Menschen übertragen werden können (Wang et al., 2007).

5.7 Bedeutung animaler Noro- und Sapoviren als Infektionserreger für den Menschen

Eine mögliche Bedeutung animaler Noro- und Sapoviren als Krankheitserreger beim Menschen ist noch nicht ausreichend geklärt. Die Möglichkeit einer zoonotischen Übertragung kann bisher nicht ausgeschlossen werden. Die Übertragung von Noro- und Sapoviren erfolgt hauptsächlich über kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser. Inwieweit eine direkte Übertragung über Lebensmittel tierischer Herkunft oder auch über den Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren erfolgen kann, ist bislang nicht geklärt. In Austern, die eine Hauptinfektionsquelle humaner Calicivirusinfektionen sind, konnten sowohl bovine Noroviren als auch porcine Noroviren und auch porcine enterale Sapoviren nachgewiesen werden (Costantini et al., 2006). Eine Übertragung von Caliciviren zwischen verschiedenen Wirtsspezies wurde bereits für Vesiviren beschrieben und kann für Noro- und Sapoviren nicht ausgeschlossen werden (Rockx, 2004). Insbesondere porcine Noroviren, die in Genogruppe II der Noroviren nahe zu humanen Vertretern eingeordnet werden (Wang et al., 2005a), sowie die Entdeckung eines porcinen enteralen Sapovirusisolates (Po/SaV/MI-QW19/2002/US), das in die Genogruppe II nahe zu humanen Sapoviren eingeordnet werden kann, deuten auf die Möglichkeit einer zoonotischen Übertragung hin. Zudem besteht durch Co-Infektion eines Menschen oder Tieres mit Noro- bzw. Sapoviren humanen und animalen Ursprungs die Möglichkeit einer Rekombination innerhalb einer Genogruppe (Wang et al., 2005b). Da für das Genus *Sapovirus* bereits Rekombinationen zwischen den Genogruppen

beschrieben wurden (Hansman et al., 2005b), können auch auf diesem Weg neue Rekombinanten entstehen, die für Tier und Mensch pathogen sind.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die aus den untersuchten Kot- und Organproben isolierten Viren zu den jeweiligen animalen Vertretern gruppiert werden können. Den humanen Vertretern ähnliche Isolate konnten in den Proben nicht gefunden werden. Die Möglichkeit eines zoonotischen Potentials von Noro- und Sapoviren konnte somit anhand der durchgeführten Untersuchungen mit den in dieser Arbeit detektierten Isolaten nicht bestätigt werden. Die Möglichkeit einer Übertragung von Noro- und Sapoviren zwischen Mensch und Tier kann in Zukunft durch Tierversuche bzw. Versuche an Freiwilligen geklärt werden. Für humane Noroviren wurde ein solcher Versuch bereits durchgeführt. Die Infektion gnotobiotischer Schweine mit Kotsuspensionen, die ein humanes Isolat enthielten, induzierte eine milde Diarrhöe bei diesen Tieren, die Ausscheidung des Virus sowie den Nachweis der Replikation in Enterozyten (Cheetham et al., 2006). Weitere Versuche dieser Art werden nötig sein, um die Frage des zoonotischen Potentials sowie die Pathogenese dieser Erreger für Mensch und Tier aufzuzeigen. Ferner sollten zusätzlich zu den bereits durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen von durch Caliciviren bedingten Gastroenteritiden beim Menschen (Sequenzierung der Erreger, Herkunft der Isolate) Hinweise auf Lebensmittel tierischer Herkunft sowie Kontakte zu landwirtschaftlichen Nutztieren als mögliche Infektionsquelle berücksichtigt werden.

6 Zusammenfassung

Noroviren und Sapoviren repräsentieren unterschiedliche Genera innerhalb der Virusfamilie *Caliciviridae*. Caliciviren sind unbehüllte RNS-Viren mit einer Größe von 27-40 nm und einem einzelsträngigen Genom positiver Polarität mit einer Länge von 7,4-7,7 Kb. Noro- und Sapoviren sind wichtige Verursacher humaner Gastroenteritiden und kommen auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren vor, im Einzelnen bovine Noroviren, porcine Noroviren und porcine enterale Sapoviren. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Ermittlung der Prävalenz und Bedeutung von Noro- und Sapovirusinfektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren durch Virusdetektion sowie die Bestimmung der Verwandtschaft zwischen animalen und humanen Isolaten. Der letztgenannte Aspekt sollte zusätzlich Hinweise liefern, inwieweit die Gefahr einer zoonotischen Übertragung von Mensch zu Tier und umgekehrt besteht.

Es wurden Kotproben von landwirtschaftlichen Nutztieren (Rindern, Schweinen, kleinen Wiederkäuern) gesammelt. Zusätzlich wurden im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Virologie eingesandte Kot- und Organproben untersucht. Ein Fragebogen zu Daten der Einzeltiere sowie zur Bestandssituation begleiteten die Probensammlung und wurde ebenso wie Angaben auf den Untersuchungsvordrucken der eingesandten Proben statistisch im Hinblick auf Zusammenhänge einer Noro- oder Sapovirusinfektion mit spezifischen Parametern analysiert. Mit Hilfe der Reversen Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) konnte Norovirus-RNS in 32 von 546 Kotproben von Rindern detektiert werden (5,9%). Darüber hinaus wurden in acht von 132 Kotproben von Schweinen Sapovirus-RNS nachgewiesen (6,1%). In der Mehrzahl der Fälle war das Vorkommen virusspezifischer RNS mit dem Vorliegen einer Diarrhøe verbunden. Statistisch signifikant war das Vorkommen von Noro- und Sapovirusinfektionen bei Jungtieren. Weitere signifikante Parameter waren bei den Norovirus-positiven Rindern (gesammelte Proben) die Jahreszeit der Probensammlung (Herbst und Winter), die Betriebsform (Zucht-, Milchviehhaltung) sowie das Bestandsproblem Atemwegserkrankungen und das Auftreten von Todesfällen im Bestand. Bei den Sapovirus-positiven Proben von Schweinen waren pathologische Veränderungen von Haut und Hautanhangsorganen signifikant. Die Untersuchung von 32 Kotproben von kleinen Wiederkäuern sowie 20 Tieren anderer Spezies auf Noro- und Sapoviren verliefen negativ, ebenso die Untersuchung von 202 Proben von Rindern auf Sapoviren und 132 Proben von Schweinen auf Noroviren.

Die RT-PCR-Produkte wurden kloniert, sequenziert und phylogenetisch analysiert. Die neu detektierten Virusisolate sind enger mit den bekannten animalen Noro- und Sapoviren

verwandt als mit den humanen Viren. In zwei Proben von Schweinen lag eine Doppelinfektion mit zwei Sapoviren aus unterschiedlichen Genogruppen vor. Je eines der Virusisolate in beiden Proben könnte eine Rekombinante aus Vertretern unterschiedlicher Genogruppen porciner enteraler Sapoviren darstellen. Der Ausdruck Isolat steht im Rahmen dieser Arbeit für Viren von denen Nukleinsäureteilsequenzen bestimmt wurden, nicht für tatsächlich angezüchtetes Virus.

Die Ergebnisse zeigen, dass Infektionen mit Noro- und Sapoviren sporadisch bei landwirtschaftlichen Nutztieren auftreten. Die Sequenzdaten geben keine Hinweise darauf, dass diese Viren direkt vom Menschen auf landwirtschaftliche Nutztiere oder umgekehrt übertragen werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden virusähnliche Partikel (VLPs) von bovinen Noroviren und porcinen enteralen Sapoviren mit Hilfe des Baculovirusexpressionssystems hergestellt. VLPs sind morphologisch und antigenetisch den nativen Virionen sehr ähnlich. VLPs für bovine Noroviren und porcine enterale Sapoviren stehen nun zur Etablierung von ELISA-Systemen zur Ermittlung der Antikörperprävalenz im Hinblick auf Noro- und Sapoviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren zur Verfügung.

7 Summary

Noroviruses and sapoviruses represent distinct genera within the virus family *Caliciviridae*. Caliciviruses are non-enveloped RNA viruses with a size of 27-40 nm and a single-stranded genome of 7.4-7.7 kb with positive polarity. Noro- and sapoviruses are important causative agents of human gastroenteritis and also occur in farm animals in particular bovine noroviruses, porcine noroviruses and porcine enteric sapoviruses. The aims of this study were to determine the prevalence and relevance of noro- and sapovirus infections in farm animals by virus detection as well as to investigate the relationship between animal and human isolates. The latter aspect addresses the possibility of virus transmission from animal to man and vice versa.

Stool samples were taken from farm animals (cattle, swine, small ruminants). In addition samples sent in for routine laboratory diagnosis at the institute of virology were also examined. A questionnaire concerning individual data as well as the situation on the farm accompanied the sampling. The questionnaire and the data on the sample submission forms of the routine samples were statistically analysed with regard to correlations between the presence of noro- and sapovirus infection and specific parameters. Using RT-PCR norovirus RNA was detected in 32 of 546 samples from calves (5.9%). In addition, eight of 132 samples from swine were positive in an RT-PCR for sapovirus (6.1%). In most cases virus detection coincided with occurrence of diarrhea. Young animals had a statistically higher risk of noro- or sapovirus infection. Other significant parameters were the season of sampling (fall, winter) in the norovirus-positive cattle (questionnaire group) as well as the farm structure (breeding, dairy cattle), respiratory disease problems and the occurrence of deaths on farms. In the sapovirus-positive swine pathological disorders of the skin and skin organs turned out to be significant. In tests for noro- and sapoviruses 32 stool samples from small ruminants as well as 20 samples from animals of other species gave negative results. In addition 202 samples from cattle for sapoviruses and 132 samples from swine for noroviruses were found to be negative.

The RT-PCR products were cloned, sequenced and phylogenetically analysed. The newly detected virus isolates are more closely related to known animal noro- and sapoviruses than to human isolates. In two samples from swine a double infection with members of two different genogroups of porcine enteric sapoviruses could be detected. One of the virus isolates in each sample may represent a recombinant between different sapoviruses. The term "isolate" stands for viruses from which partial nucleic acid sequences have been determined in this work, not for virus grown in culture.

The results demonstrate that noro- and sapoviruses occur sporadically in farm animals. The sequence data give no indication that these viruses are transmitted directly from farm animals to humans or vice versa.

The second part of the thesis addressed the production of virus-like particles (VLPs) of bovine noroviruses and porcine enteric sapoviruses using the baculovirus expression system. VLPs are morphologically and antigenetically similar to the native virions and can be used as antigens in different test systems. VLPs of bovine noroviruses and porcine enteric sapoviruses are now available to establish ELISA systems for determination of the antibody prevalence with respect to noro- and sapoviruses in farm animals.

8 Literaturverzeichnis

- Ackermann, H. (2003). BiAS für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Version 7.7. Hochheim-Darmstadt, Epsilon-Verlag.
- Adler, J. L. und Zickl, R. (1969). Winter vomiting disease. *J. Infect. Dis.* 119: 668-673.
- Alcala, A. C., Hidalgo, M. A., Obando, C., Vizzi, E., Liprandi, F., Ludert, J. E. (2003). Deteccion molecular de calicivirus entericos de bovine en venezuela. *Acta Cientifica Venezolana* 54: 148-152.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ambert-Balay, K., Bon, F., le Guyader, F., Pothier, P., Kohli, E. (2005). Characterization of New Recombinant Noroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 43(10): 5179-5186.
- Ando, T., Monroe, S. S., Gentsch, J., Jin, Q., Lewis, D. C., Glass, R. I. (1995). Detection and differentiation of antigenetically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and Southern hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 33(1): 64-71.
- Ando, T., Noel, J. S., Fankhauser, R. L. (2000). Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J. Infect. Dis.* 181: 336-648.
- Anonymus (2004). Noroviren - Maßnahmen bei Ausbrüchen in Krankenhäusern und Einrichtungen der stationären Pflege. Empfehlungen des "Zentrum für Gesundheitsschutz" - Staatliches Untersuchungsamt Hessen: 1-20.
- Anonymus (2005). Noroviren RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte (Robert-Koch-Institut, Berlin).
- Anonymus (2006). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005 (Robert-Koch-Institut Berlin).
- Anonymus (2007a). Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. Epidemiologisches Bulletin, Robert-Koch-Institut 3: 21.
- Anonymus (2007b). Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. Epidemiologisches Bulletin, Robert-Koch-Institut 21: 181.
- Ball, J. M., Hardy, M. E., Atmar, R. L., Conner, M. E., Estes, M. K. (1998). Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J Virol* 72(2): 1345-53.
- Ball, J. M., Graham, D. Y., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Guerrero, R. A., Estes, M. K. (1999). Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology* 117(1): 40-8.
- Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., Green, K. Y. (2003). In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 77(20): 10957-74.
- Berke, T., Golding, B., Jiang, X., Cubitt, D. W., Wolfaardt, M., Smith, A. W., Matson, D. O. (1997). Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *J Med Virol* 52(4): 419-24.
- Bertolotti-Ciarlet, A., White, L., Chen, R., Prasad, B. V. V., Estes, M. K. (2002). Structural requirements for the assembly of Norwalk-like particles. *J Virol* 76(8): 4044-4055.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M., Estes, M. K. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77(21): 11603-15.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1522.
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100: 243-255.
- Blakeney, S. R., Cahill, A., Reilly, P. A. (2003). Processing of Norwalk virus nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* 308: 216-224.

- Bon, F., Kohli, E., Pothier, P. Outbreaks of gastroenteritis due to sapoviruses in adults. unveröffentlicht
- Bridger, J. C., Hall, G. A., Brown, J. F. (1984). Characterization of a Calici-like Virus (Newbury Agent) Found in Association with Astrovirus in Bovine Diarrhea. *Infection and Immunity* 43(1): 133-138.
- Bridger, J. C. und Dastjerdi, A. M. (1997). Bovine Calici-like Viruses as a cause of diarrhoea in cattle. 1st International Symposium on Caliciviruses, Reading, England.
- Brinker, J. P., Blacklow, N. R., Estes, M. K., Moe, C. L., Schwab, K. J., Herrmann, J. E. (1998). Detection of Norwalk virus and other genogroup 1 human caliciviruses by a monoclonal antibody, recombinant-antigen-based immunoglobulin M capture enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 36(4): 1064-9.
- Brinker, J. P., Blacklow, N. R., Jiang, X., Estes, M. K., Moe, C. L., Herrmann, J. E. (1999). Immunoglobulin M antibody test to detect genogroup II Norwalk-like virus infection. *J Clin Microbiol* 37(9): 2983-6.
- Buesa, J., Collado, B., Lopez-Andujar, P., Abu-Mallouh, R., Rodriguez Diaz, J., Garcia Diaz, A., Prat, J., Guix, S., Llovet, T., Prats, G., Bosch, A. (2002). Molecular Epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* 40(8): 2854-2859.
- Bull, R. A., Tu, E. T. V., McIver, C. J., Rawlinson, W. D., White, P. A. (2006). Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44(2): 327-333.
- Burton-MacLeod, J. A., Kane, E. M., Beard, R. S., Hadley, L. A., Glass, R. I., Ando, T. (2004). Evaluation and Comparison of two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Antigenetically Diverse Human Noroviruses in Stool Samples. *J. Clin. Microbiol.* 42(6): 2587-2595.
- Butot, S., Putallaz, T., Sanchez, G. (2007). Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl Environ Microbiol* 73(1): 186-92.
- Chan, D. W., Sung, J. J. A., Lam, R. K. Y., Chan, P. K. S., Lee, N. L. S., Lai, R. W. M., Leung, W. K. (2006). Fecal Viral Load and Norovirus-associated Gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 12(8): 1278-1280.
- Chang, K.-O., Kim, Y., Green, K. Y., Saif, L. J. (2002). Cell-culture propagation of porcine enteric calicivirus mediated by intestinal contents is dependent on the cyclic AMP signaling pathway. *Virology* 304: 302-310.
- Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Kim, Y., Saif, L. J., Green, K. Y. (2004). Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(23): 8733-8.
- Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M. G., Saif, L. J. (2006). Pathogenesis of a Genogroup II Human Norovirus in Gnotobiotic Pigs. *J. Virol.* 80(21): 10372-10381.
- Chen, R., Neill, J. D., Estes, M. K., Prasad, B. V. (2006). X-ray structure of a native calicivirus: Structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Chiba, S., Sakuma, Y., Kogasaka, R., Akihara, M., Horino, K., Nakao, T., Fukui, S. (1979). An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J. Med. Virol.* 4(249-254).
- Chiba, S. und Nakata, S. (2000). Sapporo virus: History and recent findings. *The Journal of Infectious Diseases* 181(2): 303-308.
- Clarke, I. N. und Lambden, P. R. (2000). Organisation and Expression of Calicivirus Genes. *J. Infect. Dis.* 181: 309-316.
- Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F. S., Saif, L. J. (2006). Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl Environ Microbiol* 72(3): 1800-9.
- Cubitt, D. W., Green, K. Y., Payment, P. (1998). Prevalence of antibodies to the Hawaii Strain of human calicivirus as measured by a recombinant protein based immunoassay. *J Med Virol* 54: 135-139.

- Cubitt, W. D., McSwiggan, D. A., Moore, W. (1979). Winter vomiting caused by calicivirus. *Journal of Clinical Pathology* 32: 786-793.
- Dastjerdi, A. M., Bridger, J. C., Snodgrass, D. R., Bredl, J. C., Plummer, J. M. (1997). Characterisation of Bovine Enteric Calici-like Viruses 1st International Symposium on Caliciviruses, Reading, England.
- Dastjerdi, A. M., Green, J., Gallimore, C. I., Brown, D. W., Bridger, J. C. (1999). The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* 254(1): 1-5.
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, K. F., Hershey, J. W. B., Hardy, M. E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO Journal* 22(11): 2852-2859.
- de Leon, R., Matsui, S. M., Baric, R. S., Hermann, J. E., Blacklow, N. R., Greenberg, H. B., Sobsey, M. D. (1992). Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase - polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3151-3157.
- de Rouda Husman, A. M., Bijerk, P., Lodder, W., van den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R., Duizer, E. (2004). Calicivirus Inactivation by Nonionizing (253.7-Nanometer-Wavelength (UV)) and Ionizing (Gamma) Radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5089-5093.
- Deng, Y., Batten, C. A., Liu, B. L., Lambden, P. R., Elscher, M., Günther, H., Otto, P., Schnürch, P., Eichhorn, W., Herbst, W., Clarke, I. N. (2003). Studies of Epidemiology and Seroprevalence of Bovine Noroviruses in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 41(6): 2300-2305.
- Dingle, K. E., Lambden, P. R., Caul, E. O., Clarke, I. N. (1995). Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J. Gen. Virol.* 76: 2349-2355.
- Dingle, K. E. (2004). Mutation in a Lordsdale Norovirus Epidemic Strain as a Potential Indicator of Transmission Routes. *J Clin Microbiol* 42(9): 3950-3957.
- Dixon, W. J. (1993). *BMDP Statistical Software Manual*, Volume 1 and 2. Los Angeles, London, University of California Press.
- Dolin, R., Blacklow, N. R., DuPont, H. (1971). Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J. Infect. Dis.* 123: 307-312.
- Dolin, R., Reichman, R. C., Roessner, K. D., Tralka, T. S., Schooley, R. T., Gary, W., Morens, D. (1982). Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *The Journal of Infectious Diseases* 146(2): 184-189.
- Duizer, E., Bijerk, P., Rockx, B., de Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M. (2004a). Inactivation of Caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 4538-4543.
- Duizer, E., Schwab, K. J., Neill, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P., Estes, M. K. (2004b). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 85(Pt 1): 79-87.
- Dunham, D. M., Jiang, X., Berke, T., Smith, A. W., Matson, D. O. (1998). Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol* 143: 2421-2430.
- Efron, B., Halloran, E., Holmes, S. (1996). Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 13429-13434.
- Estes, M. K., Ball, J. M., Crawford, S. E., O'Neal, C., Opekun, A. A., Graham, D. Y., Conner, M. E. (1997). Virus-like particle vaccines for mucosal immunization. *Adv Exp Med Biol* 412: 387-95.
- Estes, M. K., Ball, J. M., Guerrero, R. A., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Pacheco, S. S., Graham, D. Y. (2000). Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 181 Suppl 2: S367-73.
- Ettayebi, K. und Hardy, M. E. (2003). Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* 77(21): 11790-11797.

- Fankhauser, R. L., Noel, J. S., Monroe, S. S., Glass, R. I., Ando, T. Detection and identification of a strain belonging to the new genogroup of "Norwalk-like viruses" in human, genogroup IV. unveröffentlicht
- Fankhauser, R. L., Noel, J. S., Monroe, S. S., Ando, T., Glass, R. I. (1998). Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *The Journal of Infectious Diseases* 178: 1571-1578.
- Fankhauser, R. L., Monroe, S. S., Noel, J. S., Humprey, C. D., Bresee, J. S., Parashar, U. D., Ando, T., Glass, R. I. (2002). Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 186(1): 1-7.
- Farkas, T., Zhong, W. M., Jing, Y., Huang, P. W., Espinosa, S. M., Martinez, N., Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Pickering, L. K., Jiang, X. (2004). Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol* 149: 1309-1323.
- Farkas, T., Nakajima, S., Sugieda, M., Deng, X., Zhong, W., Jiang, X. (2005). Seroprevalence of Noroviruses in Swine. *J Clin Microbiol* 43(2): 657-661.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (2005). Family Caliciviridae. In *Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Fauquet, C.M. , Mayo, M.A. et al. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. Vol.: 843-851.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 738-791.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: interference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22: 521-565.
- Felsenstein, J. (1993). "PHYLIP (Phylogeny Interference Package)." Department of Genetics, University of Washington, USA.
- Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., King, A. D., Mitra, T., Gorbalenya, A., Green, K. Y. (2004). Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the golgi complex in transfected cells. *J Virol* 78(9): 4827-4837.
- Flynn, W. T. und Saif, L. J. (1988). Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* 26: 206-212.
- Flynn, W. T., Saif, L. J., Moorhead, P. D. (1988). Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 49(6): 819-825.
- Fout, S. H., Martinson, B. C., Moyer, W. N., Dahling, D. R. (2003). A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3158-3164.
- Friedman, D. S., Heisey-Grove, D., Argyros, F., Berl, E., Nsubuga, J., Stiles, T., Fontana, J., Beard, R. S., Monroe, S., McGrath, M. E., Sutherby, H., Dicker, R. C., DeMaria, A., Matyas, B. T. (2005). An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with wedding cakes. *Epidemiol Infect* 133(6): 1057-63.
- Fukushi, S., Kojima, S., Takai, R., Hoshino, F. B., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K., Kageyama, T. (2004). Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of *Norovirus*. *J Virol* 78(8): 3889-3896.
- Gallei, A. (2005). Etablierung und Charakterisierung eines in vivo RNA-Rekombinationssystems: Mechanistische Studien und Erzeugung rekombinanter Pestiviren. Giessen. Dissertation
- Gallimore, C. I., Barreiros, M. A. B., Brown, D. W. G., Nascimento, J. P., Leite, J. P. G. (2004a). Norovirus associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 321-326.
- Gallimore, C. I., Cubitt, D. W., Du Plessis, N., Gray, J. J. (2004b). Asymptomatic and Symptomatic Excretion of Noroviruses during a Hospital Outbreak of Gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 42(5): 2271-2274.
- Gallimore, C. I., Iturriza-Gomara, M., Lewis, D., Cubitt, D., Cotterill, H., Gray, J. J. (2006). Characterization of Sapoviruses Collected in the United Kingdom From 1989 to 2004. *J. Med. Virol.* 78: 673-682.

- Gebhardt, J., Rethwilm, A., Rohayem, J. Generation and characterization of a full-length sapovirus clone. unveröffentlicht
- Glass, P. J., White, L. J., Ball, J. M., Leparco-Goffart, I., Hardy, M. E., Estes, M. K. (2000a). Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 74(14): 6581-91.
- Glass, R. I., Noel, J. S., Ando, T., Fankhauser, R. L., Belliot, G., Mounts, A., Parashar, U. D., Bresee, J. S., Monroe, S. S. (2000b). The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: A reassessment using new diagnostics. *The Journal of Infectious Diseases* 181(2): 254-261.
- Goldenberger, D., Steffen, I., Dutly, F., Widmer, A. (2001). Gastroenteritis outbreaks associated with Norwalk-like viruses in two semiclosed communities in Switzerland. *J. Microbiol. Methods* 47: 97.
- Gordon, I., Meneely, J. K., Currie, G. D., Chicoine, A. (1953). Clinical laboratory studies in experimentally-induced epidemic nonbacterial gastroenteritis. *J. Lab. Clin. Med.* 41: 133-141.
- Graham, D. Y., Jiang, X., Tanaka, T., Opekum, A. R., Madore, H. P., Estes, M. K. (1994). Norwalk Virus Infection of Volunteers: New Insights Based on Improved Assays. *J. Infect. Dis.* 170: 34-43.
- Gray, J. J., Jiang, X., Morgan-Capner, P., Desselberger, U., Estes, M. K. (1993). Prevalence of Antibodies to Norwalk Virus in England: Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Baculovirus-Expressed Norwalk Virus Capsid Antigen. *J. Clin. Microbiol.* 31(4): 1022-1025.
- Green, J., Gallimore, C. I., Norcott, J. P., Lewis, D., Brown, D. W. G. (1995a). Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 47(4): 392-398.
- Green, K. Y., Ando, T., Balayan, M. S., Berke, T., Clarke, I. N., Estes, M. K., Matson, D. O., Nakata, S., Neill, J. D., Studdert, M. J., Thiel, H.-J. (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 181(2): 322-30.
- Green, K. Y. (2007). The Noroviruses. In *Fields Virology*, Fifth Edition. Knipe, D.M. und Howley, P.M. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, New York. Vol. I: 949-979.
- Green, S. M., Lambden, P. R., Deng, Y., Lowes, J. A., Lineham, S., Bushell, J., Rogers, J., Caul, E. O., Ashley, C. R., Clarke, I. N. (1995b). Polymerase chain reaction detection of small round-structured viruses from two related hospital outbreaks of gastroenteritis using inosine-containing primers. *J. Med. Virol.* 45(2): 197-202.
- Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Kapikian, A. Z. (1979). Norwalk Virus in Vomitus. *Lancet* 1: 55.
- Greenberg, H. B., Valdesuso, J. R., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., McAuliffe, V. J., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. (1981). Proteins of Norwalk Virus. *J. Virol.* 37(3): 994-999.
- Griffin, D. W., Donaldson, K. A., Paul, J. H., Rose, J. B. (2003). Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. *Clinical Microbiology Reviews* 16(1): 129-143.
- Guerrero, R. A., Ball, J. M., Krater, S. S., Pacheco, S. E., Clements, J. D., Estes, M. K. (2001). Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. *J Virol* 75(20): 9713-22.
- Gunn, R. A., Janowski, H. T., Lieb, S., Prather, E. C., Greenberg, H. B. (1982). Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. *American Journal of Epidemiology* 115(3): 348-351.
- Gunson, R. N. und Carman, W. F. (2005). Comparison of Two Real-Time PCR Methods for Diagnosis of Norovirus Infection in Outbreaks and Community Settings. *J. Clin. Microbiol.* 43(4): 2030-2031.
- Günther, H. und Otto, P. (1987). Studies into diarrhoea of young calves. Seventh communication: "Zackenvirus" (Jena-Agens 117/80) - a new diarrhoea pathogen to calf. *Arch. Exp. Veterinarmed.* 41: 934-938.
- Guo, M., Chang, K. O., Hardy, M. E., Zhang, Q., Parwani, A. V., Saif, L. J. (1999). Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *J. Virol.* 73(11): 9625-9631.

- Guo, M., Evermann, J. F., Saif, L. J. (2001a). Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch Virol* 146: 479-493.
- Guo, M., Hayes, J., Cho, K. O., Parwani, A. V., Lucas, L. M., Saif, L. J. (2001b). Comparative Pathogenesis of Tissue Culture-Adapted and Wild-Type Cowden Porcine Enteric Calicivirus (PEC) in Gnotobiotic Pigs and Induction of Diarrhea by Intravenous Inoculation of Wild-Type PEC. *J. Virol.* 75(19): 9239-9251.
- Guo, M., Qian, Y., Chang, K.-O., Saif, L. J. (2001c). Expression and self-assembly in baculovirus of porcine enteric calicivirus capsids into virus-like particles and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for antibody detection in swine. *J Clin Microbiol* 39(4): 1487-1493.
- Hale, A. D., Tanaka, T. N., Kitamoto, N., Ciarlet, M., Jiang, X., Takeda, N., Brown, D. W., Estes, M. K. (2000). Identification of an epitope common to genogroup 1 "norwalk-like viruses". *J Clin Microbiol* 38(4): 1656-60.
- Hall, G. A., Bridger, J. C., Brooker, B. E., Parsons, K. R., Ormerod, E. (1984). Lesions of gnotobiotic calves experimentally infected with calicivirus-like (Newbury) agent. *Vet. Pathol.* 21: 208-215.
- Han, M. G., Smiley, J. R., Thomas, C., Saif, L. J. (2004). Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J Clin Microbiol* 42(11): 5214-24.
- Han, M. G., Wang, Q., Smiley, J. R., Chang, K. O., Saif, L. J. (2005). Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses. *J Clin Microbiol* 43(2): 778-85.
- Han, M. G., Cheetham, S., Azevedo, M., Thomas, C., Saif, L. J. (2006). Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves. *Vaccine* 24(3): 317-26.
- Hansman, G. S., Takeda, N., Katayama, K., Tu, E. T. V., McIver, C. J., Rawlinson, W. D., White, P. A. (2003). Genetic Diversity of Sapovirus in Children; Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 12(1): 141-143.
- Hansman, G. S., Doan, L. T., Kguyen, T. A., Okitsu, S., Katayama, K., Ogawa, S., Natori, K., Takeda, N., Kato, Y., Nishio, O., Noda, M., Ushijima, H. (2004a). Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch. Virol.* 149(9): 1673-1688.
- Hansman, G. S., Katayama, K., Maneekarn, N., Peerakome, S., Khamrin, P., Tonusin, S., Okitsu, S., Nishio, O., Takeda, N., Ushijima, H. (2004b). Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol* 42(3): 1305-7.
- Hansman, G. S., Matsubara, N., Oka, T., Ogawa, S., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K. (2005a). Deletion analysis of the sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles. *Arch Virol* 150(12): 2529-38.
- Hansman, G. S., Takeda, N., Oka, T., Oseto, M., Hedlund, K. O., Katayama, K. (2005b). Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 11(12): 1916-20.
- Hansman, G. S., Guntapong, R., Pongsuwanna, Y., Natori, K., Katayama, K., Takeda, N. (2006). Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch. Virol.* 151: 551-561.
- Hansman, G. S., Oka, T., Katayama, K. (2007). Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev. Med. Virol.* 17: 133-141.
- Hardy, M. E., Tanaka, T. N., Kitamoto, N., White, L. J., Ball, J. M., Jiang, X., Estes, M. K. (1996). Antigenic mapping of the recombinant Norwalk virus capsid protein using monoclonal antibodies. *Virology* 217(1): 252-61.
- Hardy, M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters* 253: 1-8.
- Hedges, S. B. (1992). The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol. Biol. Evol.* 9: 366-369.

- Herbert, T. P., Brierley, I., Brown, T. D. (1997). Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J. Gen. Virol.* 78: 1033-1040.
- Hoehne, M. und Schreier, E. (2006) "Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe." *BMC Infectious Diseases*, Technical advance, DOI: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/69>
- Höhne, M. und Schreier, E. (2000). Lebensmittelassoziierte Lebensmittelinfektionen. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 10: 770-776.
- Holtby, I., Tebbutt, G. M., Green, J., Hedgeley, J., Weeks, G., Ashton, V. (2001). Outbreak of Norwalk-like virus infection associated with salad provided in a restaurant. *Commun Dis Public Health* 4(4): 305-10.
- Honma, S., Nakata, S., Sakai, Y., Tatsumi, M., Numata-Kinoshita, K., Chiba, S. (2001). Sensitive detection and differentiation of Sapporo virus, a member of the family *Caliciviridae*, by standard and booster nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* 65: 413-417.
- Hsu, C. C., Riley, L. K., Livingston, R. S. (2006) "Molecular characterization of three novel murine noroviruses." *Virus Genes*, DOI: 10.1007/s11262-006-0060-1
- Huang, Z., Elkin, G., Maloney, B. J., Beuhner, N., Arntzen, C. J., Thanavala, Y., Mason, H. S. (2005). Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine* 23(15): 1851-1858.
- Hutson, A. M., Atmar, R. L., Graham, D. Y., Estes, M. K. (2002). Norwalk Virus Infection and Disease Is Associated with ABO Histo-Blood Group Type. *J. Infect. Dis.* 185: 1335-1337.
- Hutson, A. M., Atmar, R. L., Marcus, D. M., Estes, M. K. (2003). Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to H histo-blood group antigens. *J Virol* 77(1): 405-415.
- Hutson, A. M., Atmar, R. L., Estes, M. K. (2004). Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 12(6): 279-87.
- Ike, A. C., Roth, B. N., Bohm, R., Pfitzner, A. J., Marschang, R. E. (2007). Identification of bovine Caliciviruses (BEC) from cattle in Baden-Württemberg. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 114(1): 12-15.
- Iritani, N., Seto, Y., Kubo, H., Murakami, T., Haruki, K., Ayata, M., Ogura, H. (2003). Prevalence of Norwalk-like virus infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka city, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 41(4): 1756-1759.
- Ito, S., Takeshita, S., Nezu, A., Aihara, Y., Usuku, S., Noguchi, Y., Yokota, S. (2006). Norovirus-associated encephalopathy. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 25(7): 651-652.
- Jiang, X., Graham, D. Y., Wang, K., Estes, M. K. (1990). Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250: 1580-1583.
- Jiang, X., Wang, J., Graham, D. Y., Estes, M. K. (1992a). Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(10): 2529-34.
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y., Estes, M. K. (1992b). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66(11): 6527-32.
- Jiang, X., Wang, J., Estes, M. K. (1995). Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Arch Virol* 140: 363-374.
- Jiang, X., Cubitt, W. D., Berke, T., Zhong, W., Dai, X., Nakata, S., Pickering, L. K., Matson, D. O. (1997). Sapporo-like human caliciviruses are genetically and antigenically diverse. *Arch Virol* 142(9): 1813-27.
- Jiang, X., Huang, P. W., Zhong, W. M., Farkas, T., Cubitt, D. W., Matson, D. O. (1999). Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 83: 145-154.
- Jing, Y., Qian, Y., Huo, Y., Wang, L.-P., Jiang, X. (2000). Seroprevalence against Norwalk-like human caliciviruses in Beijing, China. *Journal of Medical Virology* 60: 97-101.
- Johnson, P. C., Mathewson, J. J., DuPont, H. L., Greenberg, H. B. (1990). Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J. Infect. Dis.* 161: 18-21.

- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N., Katayama, K. (2003). Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 41(4): 1548-1557.
- Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., Chanock, R. M. (1972). Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *J. Virol.* 10(5): 1075-1081.
- Kapikian, A. Z. (2000). The discovery of the 27-nm Norwalk virus: An historic perspective. *The Journal of Infectious Diseases* 181(2): 295-302.
- Kaplan, J. E., Feldmann, R., Campbell, D. S., Lookabaugh, C., Gary, G. W. (1982a). The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am. J. Public Health* 72: 1329-1332.
- Kaplan, J. E., Gary, G. W., Baron, R. C., Singh, N., Schonberger, L. B., Feldmann, R., Greenberg, H. B. (1982b). Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann. Intern. Med.* 96: 756-761.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., Virgin, H. W. I. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299: 1575-1578.
- Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F. B., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T., Takeda, N. (2002). Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 229: 225-239.
- Katayama, K., Miyoshi, T., Uchino, K., Oka, T., Tanaka, T., Takeda, N., Hansman, G. S. (2004). Novel recombinant sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10(10): 1874-6.
- Kawamoto, H., Yamazaki, K., Utagawa, E., Ohyama, T. (2001). Nucleotide sequence analysis and development of consensus primers of RT-PCR for detection of Norwalk-like viruses prevailing in Japan. *Journal of Medical Virology* 64: 569-576.
- Keswick, B. H., Satterwhite, T. K., Johnson, P. C., DuPont, H. L., Secor, S. L., Bitsura, J. A., Gary, G. W., Hoff, J. C. (1985). Inactivation of Norwalk Virus in Drinking Water by Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 50(2): 261-264.
- Kim, H. J., Cho, H. S., Cho, K. O., Park, N. Y. (2006). Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(4): 155-9.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kitamoto, N., Tanaka, T., Natori, K., Takeda, N., Nakata, S., Jiang, X., Estes, M. K. (2002). Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J Clin Microbiol* 40(7): 2459-65.
- Kobayashi, S., Sakae, K., Suzuki, Y., Shinozaki, K., Okada, M., Ishiko, H., Kamata, K., Suzuki, K., Natori, K., Miyamura, T., Takeda, N. (2000). Molecular Cloning, Expression, and Antigenicity of Seto Virus Belonging to Genogroup I Norwalk-like Viruses *J. Clin. Microbiol.* 38(9): 3492-3494.
- Kojima, S., Kaheyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K. (2002). Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* 100: 107-114.
- König, M., Thiel, H.-J., Meyers, G. (1998). Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Virol.* 72(5): 4492-4497.
- König, M., Bank, B., Thiel, H.-J. (2004). Noroviren und Sapoviren beim Menschen und bei Nutztieren. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 111: 335-338.
- Koopmans, M., Vinje, J., de Wit, M., Leenen, I., van der Poel, W., van Duynhoven, Y. (2000). Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in the Netherlands. *The Journal of Infectious Diseases* 181(2): 262-269.

- Koopmans, M. P. G., Vennema, H., Heersma, H., van Strien, E., van Duynhoven, Y., Brown, D., Reacher, M., Lopman, B. (2003). Early Identification of Common-Source Foodborne Virus Outbreaks in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 9(9): 1136-1142.
- Kuenkel, U. und Schreier, E. Characterization of human calicivirus isolate Potsdam, Germany, in spring 2000. unveröffentlicht
- Kukkula, M., Maunula, L., Silvennoinen, E., von Bonsdorff, C.-H. (1999). Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis.* 180: 1771-1776.
- Künkel, U., Hoehne, M., Schreier, E. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses in Germany. unveröffentlicht
- Kuritsky, J. N., Osterholm, M. T., Greenberg, H. B., Korlath, J. A., Godes, J. R., Hedberg, C. W., Forfang, J. C., Kapikian, A. Z., McCullough, J. C., White, K. E. (1984). Norwalk gastroenteritis: a community outbreak associated with bakery product consumption. *Ann Intern Med* 100(4): 519-21.
- Lambden, P. R., Caul, E. O., Ashley, C. R., Clarke, I. N. (1993). Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259: 516-519.
- Laurent, S., Vautherot, J.-F., Madelaine, M.-F., le Gall, G., Rasschaert, D. (1994). Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Capsid Protein Expressed in Baculovirus Self-Assembles into Viruslike Particles and Induces Protection. *J. Virol.* 68(10): 6794-6798.
- Le Gall, G., Huguet, S., Vende, P., Vautherot, J. F., Rasschaert, D. (1996). European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome. *J. Gen. Virol.* 77: 1693-1697.
- Le Guyader, F., Estes, M. K., Hardy, M. E., Neill, F. H., Green, J., Brown, D. W., Atmar, R. L. (1996). Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol* 141(11): 2225-35.
- Le Guyader, F. S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K. O., Alsterlund, R., Pommepuy, M., Svensson, L. (2004). Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int J Food Microbiol* 97(2): 179-86.
- Le Guyader, F. S., Bon, F., DeMedici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Gallay, A., Pommepuy, M., Pothier, P., Ruggeri, F. M. (2006). Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol* 44(11): 3878-82.
- le Pendu, J., Ruvoen-Clouet, N., Kindberg, E., Svensson, L. (2006) "Mendelian resistance to human norovirus infections." *Seminars in Immunology*, DOI: 10.1016/j.smim.2006.07.009
- Lew, J. F., Kapikian, A. Z., Valdesuso, J., Green, K. Y. (1994). Molecular characterization of Hawaii virus and other Norwalk-like viruses: evidence for genetic polymorphism among human caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 170(3): 535-542.
- Lew, J. F., Kapikian, A. Z., Jiang, X., Estes, M. K., Green, K. Y. (2000). Molecular characterization and expression of the capsid protein of a Norwalk-like virus recovered from a Desert Shield troop with gastroenteritis. *Virology* 1(319-325).
- Liu, B. L., Clarke, I. N., E.O., C., Lambden, P. R. (1995). Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch. Virol.* 140(8): 1345-1356.
- Liu, B. L., Lambden, P. R., Günther, H., Otto, P., Elschner, M., Clarke, I. N. (1999). Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *Journal of Virology* 73(1): 819-825.
- Lochridge, V. P. und Hardy, M. E. (2003). Snow Mountain virus genome sequence and virus-like particle assembly. *Virus Genes* 26(1): 71-82.
- Lodder, W. und de Rouda Husman, A. M. (2005). Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlandsq. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3): 1453-1461.

- Loisy, F., Le Cann, P., Pommeupuy, M., LeGuyader, F. (2000). An improved method for the detection of Norwalk-like caliciviruses in environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 411-415.
- Lopman, B. A., Reacher, M., Gallimore, C., Adak, G. K., Gray, J. J., Brown, D. W. G. (2003). "A summertime peak of "winter vomiting disease": Surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002." DOI: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/3/13>
- Lorenz, R. J. (1996). *Grundbegriffe der Biometrie* (3. Aufl.). Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag.
- Lyman, W. H., Raczyk, M.-L., Kroeft, S. S., Velez, C., Kase, J. A., Sobsey, M. D., Vinje, J. (2004). Molecular Detection and Epidemiology of Porcine Caliciviruses in the Americas. Second International Calicivirus Conference, Dijon, Frankreich.
- Madeley, C. R. und Cosgrove, B. P. (1975). 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2(451-452).
- Madeley, C. R. (1979). Viruses in the stools. *Journal of Clinical Pathology* 32: 1-10.
- Maguire, A. J., Green, J., Brown, D. G., Desselberger, U., Gray, J. J. (1999). Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round-structured viruses in East Anglia, United Kingdom, during the 1996-1997 season. *J. Clin. Microbiol.* 37: 81-89.
- Martin Alonso, J. M., Casais, R., Boga, J. A., Parra, F. (1996). Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J. Virol.* 70: 1261-1265.
- Martinez, M. A., Alcalá, A. C., Carruyo, G., Botero, L., Liprandi, F., Ludert, J. E. (2006). Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Vet Microbiol.*
- Martinez, N., Espul, C., Cuello, H., Zhong, W., Jiang, X., Matson, D. O. (2002). Sequence diversity of human caliciviruses recovered from children with diarrhea in Mendoza, Argentina, 1995-1998. *J. Med. Virol.* 67(2): 289-298.
- Mason, H. S., Ball, J. M., Shi, J. J., Jiang, X., Estes, M. K., Arntzen, C. J. (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11): 5335-40.
- Matson, D. O., Berke, T., Dinulos, M. B., Poet, E., Zhong, W. M., Dai, X. M., Jiang, X., Golding, B., Smith, A. W. (1996). Partial characterization of the genome of nine animal caliciviruses. *Arch Virol* 141(12): 2443-56.
- Matsuura, Y. und Tohya, Y. Complete nucleotide sequence of canine calicivirus genome. unveröffentlicht
- McGinnis, S. und Madden, T. L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 32.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999). Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5(5): 607-625.
- Medici, C. M., Martinelli, M., Ruggeri, F. M., Abelli, L. A., Bosco, S., Arcangeletti, M. C., Pinardi, F., de Conto, F., Calderaro, A., Chezzi, C., Dettori, G. (2005). Broadly Reactive Nested Reverse Transcription-PCR Using an Internal RNA Standard Control for Detection of Noroviruses in Stool Samples. *J Clin Microbiol* 43(8): 3772-3778.
- Mehta, C. und Patel, N. (1992). *StatXact-Turbo, Statistical Software for Exact Nonparametric Inference, User Manual*. Cambridge, USA.
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.-J. (1991). Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 184: 677-686.
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.-J., Thumfart, J. O. (2000). Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 276(2): 349-363.
- Meyers, G. (2003). Translation of the Minor Capsid Protein of a Calicivirus Is Initiated by a Novel Termination-dependent Reinitiation Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 278(5): 34051-34060.

- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2003). Caliciviren. In Molekulare Virologie. Modrow, S., Falke, D. et al. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg/Berlin. Vol.
- Moe, C. L., Gentsch, J., Ando, T., Grohmann, G., Monroe, S. S., Jiang, X., Wang, J., Estes, M. K., Seto, Y., Humphrey, C., Stine, S., Glass, R. I. (1994). Application of PCR To Detect Norwalk Virus in Fecal Specimens from Outbreaks of Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 32(3): 642-648.
- Morgan, D., Black, M. E., Charlett, A., John, H. (1994). Viral gastroenteritis associated with a sandwich bar. *Commun Dis Rep CDR Rev* 4(8): R91-2.
- Mounts, A. W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J. S., Noel, J., Glass, R. I. (2000). Cold Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses. *J. Infect. Dis.* 181(2): 284-287.
- Mülhardt, C. (2002). Die Klonierung von DNA-Fragmenten. In *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg. Vol.: 114-141.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., Studdert, M. J. (1999a). Coronaviridae. In *Veterinary Virology*. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J. et al. Academic Press, San Diego, California. Vol.: 495-508.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., Studdert, M. J. (1999b). Reoviridae. In *Veterinary Virology*. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J. et al. Academic Press, San Diego, California. Vol.: 391-404.
- Nakata, S., Estes, M. K., Chiba, S. (1988). Detection of Human Calicivirus Antigen and Antibody by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J. Clin. Microbiol.* 26(10): 2001-2005.
- Neill, J. D., Meyer, R. F., Seal, B. S. (1995). Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. *J. Virol.* 69(7): 4484-4488.
- Neill, J. D. (2002). The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Research* 87: 89-93.
- Nenonen, N. P., Olofsson, S., Bergstrom, T. RT-PCR for detection and identification of Calicivirus in clinical specimens. unveröffentlicht
- Nicollier-Jamot, B., Pico, V., Pothier, P., Kohli, E. (2003). Molecular Cloning, Expression, Self-Assembly, Antigenicity, and Seroepidemiology of a Genogroup II Norovirus Isolated in France. *J. Clin. Microbiol.* 41(8): 3901-3904.
- Nilsson, M., Hedlund, K.-O., Thorhagen, M., Johansen, K., Ekspong, A., Svensson, L. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2-domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. unveröffentlicht
- Noel, J. S., Ando, T., Leite, J. P., Green, K. Y., Dingle, K. E., Estes, M. K., Seto, Y., Monroe, S. S., Glass, R. I. (1997a). Correlation of patient immune response with genetically characterized Small Round-Structured Viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990-1995 *J. Med. Virol.* 53(4): 372-383.
- Noel, J. S., Liu, B. L., Humphrey, C. D., Rodriguez, E. M., Lambden, P. R., Clarke, I. N., Dwyer, D. M., Ando, T., Glass, R. I., Monroe, S. S. (1997b). Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J. Med. Virol.* 52(173-178).
- Numata, K., Hardy, M. E., Kramer, S. F., Nakata, S., Chiba, S., Estes, M. K. (1997). Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Arch. Virol.* 142(8): 1537-1552.
- Oh, D.-Y., Gaedicke, G., Schreier, E. (2003). Viral Agents of Acute Gastroenteritis in German Children: Prevalence and Molecular Diversity. *J. Med. Virol.* 71: 82-93.
- Oka, T., Katayama, K., Ogawa, S., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ushijima, H., Miyamura, T., Takeda, N. (2005). Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. *J Virol* 79(12): 7283-7290.
- Okada, M., Shinozaki, K., Ogawa, T., Kaiho, I. (2002). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch. Virol.* 147(7): 1445-1451.

- Oliver, S. L., Dastjerdi, A. M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D. W., Green, J., Bridger, J. C. (2003). Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol* 77(4): 2789-98.
- Oliver, S. L., Brown, D. W., Green, J., Bridger, J. C. (2004). A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology* 326(2): 231-9.
- Oliver, S. L., Asobayire, E., Dastjerdi, A. M., Bridger, J. C. (2006a). Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* 350: 240-250.
- Oliver, S. L., Batten, C. A., Deng, Y., Elschner, M., Otto, P., Charpilienne, A., Clarke, I. N., Bridger, J. C., Lambden, P. R. (2006b). Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses. *J Clin Microbiol* 44(3): 992-8.
- Palmer, S., Brown, D., Morgan, D. (2005). Early qualitative risk assessment of the emerging zoonotic potential of animal diseases. *BMJ* 331: 1256-1260.
- Parashar, U. D., Quiroz, E. S., Mounts, A. W., Monroe, S. S., Fankhauser, R. L., Ando, T., Noel, J. S., Bulens, S. N., Beard, R. S., Li, J.-F., Bresee, J. S., Glass, R. I. (2001). "Norwalk-Like Viruses" - Public Health Consequences and Outbreak Management. *MMWR* 50(9): 1-17.
- Park, S. I., Jeong, C., Kim, H. H., Park, S. H., Park, S. J., Hyun, B. H., Yang, D. K., Kim, S. K., Kang, M. I., Cho, K. O. (2007). "Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea." doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.010.
- Parker, T. D., Kitamoto, N., Tanaka, T., Hutson, A. M., Estes, M. K. (2005). Identification of Genogroup I and Genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid. *J Virol* 79(12): 7402-9.
- Parwani, A. V., Flynn, W. T., Gadfield, K. L., Saif, L. J. (1991). Serial propagation of porcine enteric calicivirus in a continuous cell line; Effect of medium supplementation with intestinal contents or enzymes. *Arch Virol* 120: 115-122.
- Patterson, W., Haswell, P., Fryers, P. T., Green, J. (1997). Outbreak of small round structured virus gastroenteritis arose after kitchen assistant vomited. *Commun Dis Rep CDR Rev* 7(7): R101-3.
- Petznick, S., Hoehne, M., Schreier, E. Complete nucleotide sequence of a new genotype of a human calicivirus from Germany in 2000. unveröffentlicht
- Pfister, T. und Wimmer, E. (2001). Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphate. *Journal of Virology* 75(4): 1611-1619.
- Phan, T. G., Kuroiwa, T., Kaneshi, K., Ueda, Y., Nakaya, S., Nishimura, S., Yamamoto, A., Sugita, K., Nishimura, T., Yagyu, F., Okitsu, S., Müller, W. E. G., Maneekarn, N., Ushijima, H. (2006). Changing distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Analysis of Recombinant GIIB Among Infants and Children With Diarrhea in Japan. *J. Med. Virol.* 78: 971-978.
- Podkolzin, A. T., Shipulin, G. A., Mukhina, A. A., Maleev, V. V., Braslavskaya, S. I., Kuzmina, V. N. Molecular detection of Sapovirus in children with acute gastroenteritis in Moscow during 2002-2003. unveröffentlicht
- Poljsak-Prijatelj, M., Steyer, A., Zimsek Mijovski, J., D., R. J., Barlic Maganja, D., Grom, J. (2004). Noroviruses found in the pig farm in Slovenia. Second International Calicivirus Conference, Dijon, Frankreich.
- Prasad, B. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., Estes, M. K. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286(5438): 287-90.
- Pringle, C. R. (1998). Virus Taxonomy - San Diego 1998. *Arch. Virol.* 143: 1449-1459.
- Pusch, D., Oh, D.-Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., Röske, I., Schreier, E. (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol.* 150: 929-947.
- Rabenau, H. F., Stürmer, M., Buxbaum, S., Walczok, A., Preiser, W., Doerr, H. W. (2003). Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? *Intervirology* 46: 232-238.

- Rahlf, V. W. (2002). TESTIMATE6 User's Manual. Gauting/München, idv-Data Analysis & Study Planning.
- Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Jiang, X., Matson, D. O., Szucs, G. Detection and Genetic Analysis of Human Caliciviruses from Sporadic Gastroenteritis Infections in Hungary unveröffentlicht
- Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Jiang, X., Matson, D. O., Szucs, G. (2002). Molecular epidemiology of human calicivirus gastroenteritis outbreaks in Hungary, 1998 to 2000. *J. Med. Virol.* 68(3): 390-398.
- Reuter, G., Biro, H., Szucs, G. (2007). Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Arch. Virol.* 152: 611-614.
- Richards, A. F., Lopman, B., Gunn, A., Curry, A., Ellis, D., Cotterill, H., Ratcliffe, S., Jenkins, M., Appleton, H., Gallimore, C. I., Gray, J. J., Brown, D. W. G. (2003). Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *Journal of Clinical Virology* 26: 109-115.
- Richards, G. P., Watson, M. A., Fankhauser, R. L., Monroe, S. S. (2004a). Genogroup I and II Noroviruses Detected in Stool Samples by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Highly Degenerate Universal Primers. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12): 7179-7184.
- Richards, G. P., Watson, M. A., Kingsley, D. H. (2004b). A SYBR Green real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools *J. Virol. Methods* 116: 63-70.
- Riddle, M. S., Smoak, B. L., Thornton, S. A., Bresee, J. S., Faix, D. J., Putnam, S. D. (2006) "Epidemic infectious gastrointestinal illness aboard U.S. Navy ships deployed to the Middle East during peacetime operations - 2000-2001." DOI: 10.1.1186/1471-230X-6-9
- Rinehart-Kim, J. E., Zhong, W. M., Jiang, X., Smith, A. W., Matson, D. O. (1999). Complete nucleotide sequence and genomic organization of a primate calicivirus, Pan-1. *Arch. Virol.* 144(1): 199-208.
- Riordan, T., Craske, J., Roberts, J. L., Curry, A. (1984). Food borne infection by a Norwalk like virus (small round structured virus). *Journal of Clinical Pathology* 37: 817-820.
- Robinson, S., Clarke, I. N., Vipond, I. B., Caul, E. O., Lambden, P. R. (2002). Epidemiology of human Sapporo-like caliciviruses in the south west of England: Molecular characterisation of a genetically distinct isolate. *Journal of Medical Virology* 67: 282-288.
- Rockx, B., de Wit, M., Vennema, H., Vinje, J., de Bruin, E., van Duynhoven, Y., Koopmans, M. P. G. (2002). Natural History of Human Calicivirus Infection: A Prospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases* 35: 246-253.
- Rockx, B. (2004). Norovirus Infections - Disease, Antibody responses and Susceptibility. Utrecht. Dissertation
- Rohayem, J., Münch, J., Rethwilm, A. (2005). Evidence of Recombination in the Norovirus Capsid Gene. *Journal of Virology* 79(8): 4977-4990.
- Rohayem, J., Robel, I., Jager, K., Scheffler, U., Rudolph, W. (2006). Protein-Primed and De Novo Initiation of RNA Synthesis by Norovirus 3Dpol. *J. Virol.* 80(14): 7060-7069.
- Saif, L. J., Bohl, E. H., Theil, K. W., Cross, R. F., House, J. A. (1980). Rotavirus-Like, Calicivirus-Like, and 23-nm Virus-Like Particles Associated with Diarrhea in Young Pigs. *J. Clin. Microbiol.* 12(1): 105-111.
- Sair, A. I., D'Souza, D. H., Jaykus, L. A. (2002a). Human Enteric Viruses as Causes of Foodborne Disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1: 73-89.
- Sair, A. I., D'Souza, D. H., Moe, C. L., Jaykus, L.-A. (2002b). Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 100: 57-69.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(12): 5463-5467.

- Santoni, R., Crudeli, S., DiBartolo, I., Ruggeri, F. M., Magnino, S. (2004). Molecular characterization of bovine noroviruses in Italian Herds. Second International Calicivirus Conference, Dijon, Frankreich.
- Schreier, E., Döring, F., Künkel, U. (2000). Molecular Epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch. Virol.* 145: 443-453.
- Schuffenecker, I., Ando, T., Thouvenot, D., Lina, B., Aymard, M. (2001). Genetic classification of "Sapporo-like viruses". *Arch. Virol.* 146(11): 2115-2132.
- Schwab, K. J., De Leon, R., Sobsey, M. D. (1996). Immunoaffinity Concentration and Purification of Waterborne Enteric Viruses for Detection by Reverse Transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6): 2086-2094.
- Schwab, K. J., Neill, F. H., Fankhauser, R. L., Daniels, N. A., Monroe, S. S., Bergmire-Sweet, D. A., Estes, M. K., Atmar, R. L. (2000). Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and Hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. 66(1): 213-218.
- Scipioni, A., Thiry, E., Bourgot, I., Ziant, D., Czaplicki, G., de Mol, P., Lomba, M. (2004). Genetic relationship between calicivirus isolated in bovine species and human noroviruses. Second International Calicivirus Conference, Dijon, Frankreich.
- Seah, E. L., Marshall, J. A., Wright, P. J. (2003). trans Activity of the Norovirus Camberwell Proteinase and Cleavage of the N-Terminal Protein Encoded by ORF1. *J. Virol.* 77(12): 7150-7155.
- Shuman, S. (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269: 32678-32684.
- Simpson, R., Aliyu, S., Iturriza-Gomara, M., Desselberger, U., Gray, J. (2003). Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. *Journal of Medical Virology* 70: 258-262.
- Smiley, J. R., Chang, K. O., Hayes, J., Vinje, J., Saif, L. J. (2002). Characterization of an Enteropathogenic Bovine Calicivirus Representing a Potentially New Calicivirus Genus. *J. Virol.* 76(20): 10089-10098.
- Smiley, J. R., Hoet, A. E., Traven, M., Tsunemitsu, H., Saif, L. J. (2003). Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J Clin Microbiol* 41(7): 3089-99.
- Someya, Y., Takeda, N., Miyamura, T. (2000). Complete nucleotide sequence of the chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Virology* 278(2): 490-500.
- Sosnovtsev, S. und Green, K. Y. (1995). RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology* 210(2): 383-390.
- Sosnovtseva, S. A., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y. (1999). Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J. Virol.* 73: 6626-6633.
- Sugieda, M., Nagaoka, Y., Ohshita, T., Nakamura, S., Nakajima, S. (1998). Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 143: 1215-1221.
- Svensson, L. (2000). Diagnosis of foodborne viral infections in patients. *International Journal of Food Microbiology* 59: 117-126.
- Tacket, C. O. (2005). Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 23(15): 1866-1869.
- Tajiri-Utagawa, E. (2004). Small round structured viruses (SRVs) and transmission electron microscopy. *African Journal of Biotechnology* 3(1): 8-11.
- Tan, M. und Jiang, X. (2005a). The P-Domain of Norovirus Capsid Protein Forms a Subviral Particle That Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *J. Virol.* 79(22): 14017-14030.

- Tan, M. und Jiang, X. (2005b) "Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle." *Trends in Microbiology*, DOI: 10.1016/j.tim.2005.04.004
- Thornhill, T. S., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., Kapikian, A. Z., Channock, R. M. (1975). Pattern of shedding of the Norwalk particle in stools during experimentally induced gastroenteritis in volunteers as determined by immune electron microscopy. *J. Infect. Dis.* 132: 28-34.
- Thumfahrt, J. O. und Meyers, G. (2002). Feline calicivirus: recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. *J. Virol.* 76(12): 6398-6407.
- Utagawa, E. T., Nakazawa, E., Matsuo, K., Oishi, I., Takeda, N., Miyamura, T. (2002). Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *Journal of Virological Methods* 100: 49-56.
- van der Heide, R., Geerestein, R., Vinje, J., van der Poel, W. H. M. Detection of swine enteric calicivirus closely related to human sapoviruses. unveröffentlicht
- van der Poel, W. H. M., Vinje, J., van der Heide, R., M.-I., H., Vivo, A., Koopmans, M. P. G. (1996). Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 36-41.
- van der Poel, W. H. M., van der Heide, R., Verschoor, F., Gelderblom, H., Vinje, J., Koopmans, M. P. G. (2003). Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in the Netherlands. *Vet. Microbiol.* 92: 297-309.
- Vennema, H., de Bruin, E., Koopmans, M. P. G. (2002). Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Virol.* 25: 233-235.
- Vinje, J. und Koopmans, M. P. G. (1996). Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J. Infect. Dis.* 174(3): 610-615.
- Vinje, J., Deijl, H., van der Heide, R., Lewis, D., Hedlund, K.-O., Svensson, L., Koopmans, M. P. G. (2000a). Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *J Clin Microbiol* 38(2): 530-536.
- Vinje, J., Green, J., Lewis, D. C., Gallimore, C. I., Brown, D. W. G., Koopmans, M. P. G. (2000b). Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of Norwalk-like viruses. *Arch. Virol.* 145(2): 223-241.
- Vinje, J., Vennema, H., Maunula, L., von Bonsdorff, C.-H., Hoehne, M., Schreier, E., Richards, A., Green, J., Brown, D., Beard, S. S., Monroe, S. S., de Bruin, E., Svensson, L., Koopmans, M. P. G. (2003). International Collaborative Study to Compare Reverse Transkriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 41(4): 1423-1433.
- Vinje, J., Hamidjaja, R. A., Sobsey, M. D. (2004). Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J. Virol. Methods* 116: 109-117.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 615-619.
- Wang, J., Jiang, X., Madore, H. P., Gray, J., Desselberger, U., Ando, T., Seto, Y., Oishi, I., Lew, J. F., Green, K. Y., Estes, M. K. (1994). Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *Journal of Virology* 68(9): 5982-5990.
- Wang, Q.-H., Constantini, V., Saif, L. J. (2007). Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine* 2007(doi: 10.1016/j.vaccine.2006.10.032).
- Wang, Q. H., Han, M. G., Cheetham, S., Souza, M., Funk, J. A., Saif, L. J. (2005a). Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 11(12): 1874-81.
- Wang, Q. H., Han, M. G., Funk, J. A., Bowman, G., Janies, D. A., Saif, L. J. (2005b). Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *J Clin Microbiol* 43(12): 5963-72.
- White, L. J., Hardy, M. E., Estes, M. K. (1997). Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *J Virol* 71(10): 8066-72.

- Widdowson, M.-A., Cramer, E. H., Hadley, L. A., Bresee, J. S., Beard, R. S., Bulens, S. N., Charles, M., Chege, W., Isakbaeva, E., Wright, J. G., Mintz, E., Forney, D., Massey, J., Glass, R. I., Monroe, S. S. (2004). Outbreaks of Acute Gastroenteritis on Cruise Ships and on Land: Identification of a Predominant Circulating Strain of Norovirus - United States, 2002. *JID* 190: 27-36.
- Widdowson, M. A., Rockx, B., Schepp, R., van der Poel, W. H., Vinje, J., van Duynhoven, Y. T., Koopmans, M. P. (2005). Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol* 76(1): 119-28.
- Wise, A. G., Monroe, S. S., Hanson, L. E., Grooms, D. L., Sockett, D., Maes, R. K. (2004). Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups. *Virus Research* 100: 165-177.
- Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y., Virgin, H. W. I. (2004). Replication of Norovirus in Cells Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages *PLoS Biol* 2(12): 2076-2084.
- Wobus, C. E., Thackray, L. B., Virgin, H. W. t. (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 80(11): 5104-12.
- Wolfaardt, M., Taylor, M. B., Berke, T., Matson, D. O., Jiang, X. Sapporo-like Human Caliciviruses in South Africa. unveröffentlicht
- Woode, G. N. und Bridger, J. C. (1978). Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J. Med. Microbiol* 11(4): 441-452.
- Wyatt, R. G., Dolin, R., Blacklow, N. R. (1974). Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J. Infect. Dis.* 129: 709-714.
- Yamashita, T., Ito, M., Kabashima, Y., Tsuzuki, H., Fujiura, A., Sakae, K. (2003). Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. *J. Gen. Virol.* 84: 3069-3077.
- Yin, Y., Tohya, Y., Ogawa, Y., Numazawa, D., Kato, K., Akashi, H. (2006). Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. *Arch. Virol.* 151: 1749-1759.
- Yuen, L. K. W., Catton, M. G., Cox, B. J., Wright, P. J., Marshall, J. A. (2001). Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. *J Clin Microbiol* 39(7): 2690-2694.
- Zahorsky, J. (1929). Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Archives of Paediatrics* 46: 391-395.
- Zeitler, C. E., Estes, M. K., Venkataram Prasad, B. V. (2006). X-ray crystallographic structure of the norwalk virus protease at 1.5-Å resolution. *J Virol* 80(10): 5050-8.
- Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., Monroe, S. S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346(2): 312-23.

9 Anhang

9.1 Rohdaten der untersuchten Kot- und Organproben

Verwendete Abkürzungen (in alphabetischer Reihenfolge):

a:	Jahre
B:	Bestandsproblem
BRSV:	Bovines respiratorisches Synzytialvirus
BVD/MD:	Bovine Virusdiarrhöe/Mucosal Disease
CCN:	Zerebrokortikalnekrose
cpe:	zytopathogen
d:	Tage
DA:	Deutsch Angus
DF:	Durchfall
DFV:	Deutsch Fleckvieh
erhebl.:	erheblich
hgrd.:	hochgradig
HF:	Holstein Frisian
HKT:	Hämatokrit
IF:	Immunfluoreszenz
k:	kastriert
kath.:	katarrhalisch
KP Rd.:	Kotprobe Rind
KP Schw.:	Kotprobe Schwein
Ln(n).:	Lymphknoten
m:	Monate
metabol.:	metabolisch
ncp=	nicht-zytopathogen
obB:	ohne besonderen Befund
P:	pathologisch-anatomische Befunde
RHF:	Red Holstein Frisian
SH:	Schleimhaut
V.a.:	Verdacht auf
Vit.:	Vitamin
w:	Wochen
ZNS:	Zentralnervensystem
z.T.:	zum Teil
+:	verstorben/euthanasiert

9.1.1 Rohdaten Rind – eingesandte Proben

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben-entnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
001	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	negativ	negativ
002	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	Corona	-	43	nein	negativ	negativ
003	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	Rota	-	43	nein	negativ	negativ
004	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	positiv	negativ
005	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	Rota	-	43	nein	negativ	negativ
006	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	negativ	negativ
007	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	Rota	-	43	nein	negativ	negativ
008	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	Rota	-	43	nein	positiv	negativ
009	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	negativ	negativ
010	09.03.03	10 d	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	negativ	negativ
011	09.03.03	5 d	männlich	HF	Nidderau/Main- Kinzig-Kreis	61130	Kot	ja	Rota	-	1	nein	negativ	negativ
012	17.03.03	-	-	-	Alsfeld/ Vogelsbergkreis	36404	Kot	ja	negativ	-	3	nein	negativ	negativ
013	17.03.03	-	-	-	Alsfeld/ Vogelsbergkreis	36404	Kot	ja	negativ	-	3	nein	negativ	negativ
014	20.03.03	7 d	männlich	Fleckvieh	Giessen- Kleinlinden/ Giessen	35398	Kot	ja	negativ	-	4	nein	negativ	negativ
027	02.04.03	4 d	weiblich	DFV x Charolais	Weilburg/Lim- burg-Weilburg	35784	Kot	ja	negativ	-	19	nein	negativ	negativ
028	07.04.03	10 d	weiblich	Limousin	Friedwald/Hers- feld-Rotenburg	36289	Kot	ja	negativ	-	22	nein	negativ	negativ
029	07.04.03	10 d	weiblich	Limousin	Friedwald/Hers- feld-Rotenburg	36289	Kot	ja	negativ	-	22	nein	negativ	negativ
030	07.04.03	10 d	weiblich	Limousin	Friedwald/Hers- feld-Rotenburg	36289	Kot	ja	negativ	-	22	nein	negativ	negativ
031	08.04.03	5 w	weiblich	-	Gladenbach/ Marburg- Biedenkopf	35075	Kot	nein	negativ	-	23	nein	negativ	negativ
035	09.04.03	5 d	-	Limousin	Friedwald/Hers- feld-Rotenburg	36289	Kot	ja	negativ	-	22	nein	negativ	negativ
037	09.04.03	5 d	-	Limousin	Friedwald/Hers- feld-Rotenburg	36289	Kot	ja	negativ	-	22	nein	negativ	negativ
038	14.04.03	13 d	weiblich	HF	Linden/Giessen	35440	Kot	ja	Rota	-	24	nein	negativ	negativ
039	14.04.03	6 d	weiblich	DFV	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	Trinkschwäche, Bronchopneumonie	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
040	14.04.03	10 d	weiblich	DFV	Reinheim/Darm- stadt-Dieburg	64354	Kot	ja	negativ	-	14	metabolische Azidose	negativ	negativ
041	16.04.03	13 d	weiblich	Charolais	Haiger/ Lahn-Dill-Kreis	35768	Kot	ja	negativ	-	27	Trinkschwäche, Sepsisverdacht	negativ	negativ
042	16.04.03	9 d	männlich	HF	Frankenau/ Waldeck- Frankenberg	35110	Kot	ja	Rota	-	21	nein	negativ	negativ
046	22.04.03	11 d	männlich	Mix	Wilmsdorf/Sie- gen-Wittgenstein	57234	Kot	ja	negativ	-	30	nein	negativ	negativ
047	22.04.03	3 w	männlich	-	Haiger/ Lahn-Dill-Kreis	35708	Kot	ja	negativ	-	31	Fieber (41,1°C)	negativ	negativ
048	22.04.03	14 d	-	-	Feldatal/ Vogelsbergkreis	36325	Kot	ja	Rota	-	32	nein	negativ	negativ
049	22.04.03	14 d	-	-	Feldatal/ Vogelsbergkreis	36325	Kot	ja	negativ	-	32	nein	negativ	negativ
050	22.04.03	14 d	-	-	Feldatal/ Vogelsbergkreis	36325	Kot	ja	negativ	-	32	nein	negativ	negativ
051	25.04.03	14 d	männlich	Charolais	Haiger/ Lahn-Dill-Kreis	35708	Kot	ja	negativ	-	31	Trinkschwäche, Fieber	negativ	negativ
054	13.10.04	2 w	-	HF	Weinheim/ Rhein-Neckar- Kreis	69469	Kot	ja	negativ	-	260	-	negativ	-
055	02.05.03	10 d	weiblich	HF	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	Trinkschwäche	negativ	negativ
056	02.05.03	5 d	-	-	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35235	Kot	ja	negativ	-	38	nein	positiv	-
057	02.05.03	5 d	-	-	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35235	Kot	ja	negativ	-	38	nein	positiv	-
058	02.05.03	3 d	männlich	Mix	Greifenstein/ Lahn-Dill-Kreis	35753	Kot	ja	negativ	-	39	nein	negativ	negativ
059	02.05.03	-	-	-	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	nein	negativ	negativ
060	02.05.03	-	-	-	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	nein	negativ	negativ
061	02.05.03	-	-	-	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	nein	negativ	negativ
062	02.05.03	-	-	-	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	nein	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
063	02.05.03	-	-	-	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	nein	positiv	-
066	07.05.03	4 d	männlich	HF	Giessen/ Giessen	35392	Kot	ja	Rota	-	43	nein	positiv	negativ
067	09.05.03	5-6 d	weiblich	HF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35235	Kot	ja	Rota	-	38	Schwäche	positiv	-
068	09.05.03	5-6 d	männlich	HF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35235	Kot	ja	negativ	-	38	Schwäche	negativ	negativ
069	09.05.03	3 d	weiblich	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	45	nein	negativ	negativ
070	13.05.03	5 m	weiblich	Limousin - Mix	Nordeck/ Giessen	35469	Kot	ja	negativ	-	49	nein	negativ	negativ
075	14.05.03	8 d	männlich	DFV	Limbach/Neckar- Odenwald-Kreis	74838	Kot	ja	negativ	-	50	Alopezie, festliegend	negativ	-
076	15.05.03	3 w	weiblich	HF	Löhnberg/Lim- burg-Weilburg	35792	Kot	ja	negativ	-	52	DF blutig-wässrig	negativ	-
077	20.05.03	4 d	männlich	Mix	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	Rota	-	45	nein	negativ	-
084	26.05.03	14 d	weiblich	HF	Linden/Giessen	35440	Kot	ja	negativ	-	62	Schwäche, Festliegen	negativ	-
085	30.05.03	3 w	männlich	Mix	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	ja	negativ	-	16	prämaturer Neonat, Sepsisverdacht	positiv	-
086	02.06.03	11 d	weiblich	RHF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	64	Trinkschwäche	negativ	negativ
087	05.06.03	10 d	weiblich	HF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	66	Exsikkose, hgrd. Azidose, Kot mit Blut und SH-Fetzen	negativ	negativ
091	23.06.03	12 d	männlich	RHF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	Rota	-	71	Festliegen	negativ	negativ
092	24.06.03	4 d	männlich	HF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	71	Schwäche	negativ	negativ
101	25.06.03	9 d	männlich	Mix	Hornberg/Ohm/ Vogelsbergkreis	35315	Kot	ja	Corona	-	75	Trinkschwäche, Stehvermögen eingeschränkt	negativ	negativ
102	25.06.03	13 d	männlich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	Omphalitis simplex	negativ	negativ
103	25.06.03	2 d	weiblich	HF	Bad Vilbel/ Wetteraukreis	61118	Kot	ja	negativ	-	76	DF wässrig (gelblicher, schleimiger Kot)	negativ	negativ
104	26.06.03	5 d	männlich	HF	Mengerskirchen/ Limburg- Weilburg	35794	Kot	ja	negativ	-	78	Trinkschwäche	positiv	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhö Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
105	01.07.03	1 w	weiblich	DFV	Reinheim/ Darm- stadt-Dieburg	64354	Kot	ja	negativ	-	14	Schwäche	negativ	negativ
106	01.07.03	3 w	männlich	HF	Wölfersheim/ Wetteraukreis	61200	Kot	ja	negativ	-	82	Hernia umbilicalis	negativ	negativ
107	01.07.03	5 d	männlich	RHF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	83	blutiger DF seit 2. d, Exsikkose, Azidose	negativ	negativ
110	03.07.03	14 d	männlich	HF	Kronberg/ Hochtaunuskreis	61476	Kot	ja	negativ	-	87	Schwäche	negativ	negativ
111	04.07.03	5 d	männlich	DFV	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	ja	negativ	-	16	B: DF	negativ	negativ
112	04.07.03	5 d	weiblich	DFV	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	ja	negativ	-	16	B: DF	negativ	negativ
113	10.07.03	8 d, +	weiblich	HF	Fronhausen/ Marburg- Biedenkopf	35112	Darm	ja	negativ	negativ	89	nach Einlieferung an Enteritis verstorben	negativ	negativ
114	15.07.03	2 d, +	männlich	RHF x DFV	Rödermark/ Offenbach	63322	Darm	ja	negativ	negativ	91	Dyspnoe, kath. Abomasoenteritis, verstorben	negativ	negativ
115	17.07.03	6 m	weiblich	HF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	Rota	-	93	DF chronisch-wässrig, 1 Tier verendet, 2 krank, SH-Läsionen	negativ	negativ
116	19.07.03	7 d	männlich	HF x DFV	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	94	Omphalitis	negativ	negativ
117	23.07.03	1 w	männlich	HF	Fronhausen/ Marburg- Biedenkopf	35112	Kot	ja	negativ	-	89	B: DF	negativ	negativ
118	30.07.03	10 d	männlich	DFV	Hornberg/Ohm/ Vogelsbergkreis	35315	Kot	ja	Rota	-	75	2. Tier mit DF im Bestand, Azidose, Corona bei 1 Tier	negativ	-
119	04.08.03	2 Wo	männlich	HF	Heuchelheim/ Giessen	35452	Kot	ja	negativ	-	99	-	negativ	-
120	05.08.03	2 w, +	männlich	HF	Obernörlen/ Wetteraukreis	61239	Darm	ja	negativ	negativ	101	kath. Abomasoenteritis	negativ	negativ
129	15.08.03	2 w, +	weiblich	DFV	Dierstein- Wetges/ Main- Kinzig-Kreis	63633	Darm	ja	negativ	negativ	107	Bronchopneumonie, Anämie, Abomasoenteritis	negativ	-
130	19.08.03	9 d	weiblich	HF	Ehringshausen/ Lahn-Dill-Kreis	35630	Kot	ja	Rota	-	80	nein	negativ	-
131	18.08.03	0, +	weiblich	HF	Obernörlen/ Wetteraukreis	61239	Darm	nein	-	negativ	101	nein	negativ	-
132	20.08.03	-	-	-	Nordenham/ Wesermarsch	26954	Kot	ja	negativ	-	108	-	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzeltier	EM-Befund	Zellkultur/IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzeltier/Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
134	20.08.03	-	-	-	Borken/Borken	46325	Kot	ja	negativ	-	110	Speichelfluß, Schwellung Guttralebereich, keine Tränkeaufnahme	negativ	-
135	29.08.03	13 d, +	weiblich	DFV	Hebstein/Vogelsbergkreis	36358	Darm	ja	negativ	negativ	112	unruhig, keine Tränkeaufnahme, konnte nicht mehr stehen	negativ	-
136	03.09.03	8 d	männlich	HF	Kinzenbach/Giessen	35452	Kot	ja	negativ	-	81	B: DF	negativ	-
137	03.09.03	8 d	weiblich	HF	Kinzenbach/Giessen	35452	Kot	ja	negativ	-	81	B: DF	negativ	-
138	08.09.03	1 w	männlich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	positiv	-
139	08.09.03	1 w	weiblich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	negativ	-
140	08.09.03	-	-	HF	Gründau/Main-Kinzig-Kreis	63584	Kot	ja	negativ	-	115	nein	negativ	-
141	09.09.03	3 w	männlich	RHF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	DF wässrig, olivgrün	negativ	-
142	11.09.03	2 w	-	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	negativ	-
143	11.09.03	-	weiblich	-	-	-	Kot	-	negativ	-	117	-	negativ	-
144	11.09.03	-	weiblich	-	-	-	Kot	-	negativ	-	117	-	negativ	-
145	11.09.03	-	weiblich	-	-	-	Kot	-	negativ	-	117	-	negativ	-
146	11.09.03	-	weiblich	-	-	-	Kot	-	negativ	-	117	-	negativ	-
147	15.09.03	5 d	weiblich	HF x Limousin	Romrod/Vogelsbergkreis	36329	Kot	ja	Rota	-	119	DF wässrig, gelb	negativ	-
148	16.09.03	-	weiblich	-	Barver/Diepholz	46453	Kot	ja	negativ	-	118	Fieber (40 °C), Exsikkose, festliegend	negativ	-
149	16.09.03	1 d	weiblich	HF	Bad Berleburg/Siegen-Wittgenstein	57319	Kot	nein	negativ	-	121	Lebensschwäche-syndrom	negativ	-
150	17.09.03	8 w	männlich	DFV	Beselich/Limburg-Weilburg	65614	Kot	nein	-	-	16	Bronchopneumonie	negativ	-
151	23.09.03	10 d, +	weiblich	-	Brombach/Odenwaldkreis	64753	Darm	ja	negativ	negativ	126	kath. akute diffuse Enteritis, Lymphadenitis Mesenterialn.	negativ	negativ
152	30.09.03	1 w	weiblich	-	Weinbach/Limburg-Weilburg	35796	Kot	ja	Rota	-	127	Trinkschwäche, Apathie	positiv	-
155	10.10.03	5 w	männlich	-	Echzell/Wetteraukreis	61209	Kot	ja	Rota	-	131	seit 3 d DF (bräunlich-suppig)	negativ	negativ
156	10.10.03	-	weiblich	-	Bad Berleburg/Siegen-Wittgenstein	57319	Kot	ja	negativ	-	121	nein	negativ	negativ
157	10.10.03	4 a, +	weiblich	HF	Nimshuscheid/Bitburg-Prüm	54612	Darm	ja	negativ	Pestivirus (cp und ncp)	129	blutiger DF, Anorexie, SH-Erosion, Leberabszess	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
158	13.10.03	3 d	weiblich	HF	Herbelhausen/ Waldeck- Frankenberg	35285	Kot	ja	negativ	-	68	Trinkschwäche, Pneumonie, mittelbreitiger pastöser Kot	negativ	-
159	20.10.03	15 d	männlich	DFV	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	nein	negativ	negativ
160	22.10.03	2 w	weiblich	HF	Herbelhausen/ Waldeck- Frankenberg	35285	Kot	ja	negativ	-	68	Bronchopneumonie, DF seit 2 (dünnbreitig)	negativ	negativ
161	24.10.03	-, +	-	-	Großostheim/ Aschaffenburg	63762	Darm	ja	negativ	negativ	133	verstorben	negativ	negativ
162	27.10.03	2 m, +	weiblich	-	Beselich/Limburg-Weilburg	65614	Darm	nein	negativ	negativ	16	Bronchopneumonie, Emphysem, verstorben	negativ	negativ
163	31.10.03	0 d	-	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	negativ	-
164	31.10.03	0 d	-	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	Rota	-	43	nein	negativ	-
165	03.11.03	-	-	HF	Rauschenberg/ Marburg- Biedenkopf	35282	Kot	ja	negativ	-	137	DF seit 4 d	negativ	-
166	03.11.03	3 m	weiblich	Galloway	Elbtal/Limburg-Weilburg	65627	Kot	ja	negativ	-	138	perakutes Festliegen	negativ	-
167	04.11.03	-	-	-	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	nein	negativ	-
168	10.11.03	-	-	-	Großbeeren/ Teltow-Fläming	14979	Kot	ja	negativ	-	142	-	negativ	-
169	11.11.03	5,5 a	weiblich	RHF	Heusenstein/ Offenbach	63150	Kot	nein	negativ	-	143	V.a. Botulismus, Blut im Kot, Lähmungen, Labmagenulcus, weiche Niere	negativ	-
170	11.11.03	14 d	weiblich	HF	Kronberg/Hochtaunuskreis	61476	Kot	ja	negativ	-	87	schlechte Tränkeaufnahme	positiv	-
176	15.11.03	-	-	-	Mainhardt/ Schwäbisch-Hall	74535	Kot	ja	negativ	-	153	-	negativ	-
177	20.11.03	8 d	männlich	Limousin	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	Rota	-	154	zuvor Pneumonie, 1 anderes Kalb verstorben	negativ	-
178	22.11.03	-	weiblich	-	Gl-Klein-Linden/ Giessen	35398	Kot	ja	negativ	-	4	-	negativ	-
179	22.11.03	2 d	weiblich	HF	Diemelstadt/ Waldeck- Frankenberg	34474	Kot	ja	negativ	-	146	nein	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
180	22.11.03	-	-	-	Boulaide/ Luxemburg	-	Kot	ja	negativ	-	215	-	negativ	-
181	22.11.03	1 m	männlich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	nein	positiv	-
182	24.11.03	10 d	weiblich	Limousin	Wilnsdorf/Sie- gen-Wittgenstein	57234	Kot	ja	Rota	-	145	nein	negativ	-
183	26.11.03	5 d	weiblich	Charolais - Mix	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	Rota	-	29	Durchfall wässrig	negativ	negativ
184	26.11.03	-	-	-	Diemelstadt/ Waldeck- Frankenberg	34474	Kot	ja	negativ	-	146	Saugunlust	negativ	negativ
185	02.12.03	-	-	-	Zülpich/ Euskirchen	53909	Kot	ja	Rota	-	147	-	negativ	-
186	02.12.03	-	-	-	Stadthagen/ Schaumburg	31655	Kot	ja	negativ	-	148	-	negativ	-
187	02.12.03	2 d	männlich	HF	Kronberg/ Hochtaunuskreis	61476	Kot	ja	negativ	-	87	Kalb aus erschwertem Auszug	negativ	-
188	03.12.03	-	weiblich	-	-	-	Kot	ja	negativ	-	149	-	negativ	-
189	05.12.03	7 d	weiblich	HF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	65	-	negativ	-
190	05.12.03	7 d	weiblich	HF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	65	-	negativ	-
191	05.12.03	7 d	männlich	HF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	65	-	negativ	-
192	05.12.03	7 d	weiblich	HF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Darm	ja	negativ	negativ	65	kath. Enteritis	negativ	-
193	09.12.03	14 d	männlich	HF	Mücke-Merlau/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	83	nein	negativ	-
194	09.12.03	-	-	-	Ehringshausen/ Lahn-Dill-Kreis	35630	Kot	ja	negativ	-	80	nein	negativ	-
195	15.12.03	2 a	weiblich	HF	Reichelsheim/ Odenwaldkreis	64385	Kot	ja	negativ	-	155	schlechtes Allgemein- befinden nach Geburt, sehr mager, DF	negativ	-
196	15.12.03	9 d	weiblich	HF	Kronberg/ Hochtaunuskreis	61476	Kot	ja	Rota	-	87	nein	negativ	-
197	16.12.03	9 d	männlich	Galloway	Elbtal/Limburg- Weilburg	65627	Kot	ja	Rota	-	138	Trinkschwäche	negativ	-
198	16.12.03	6 d	männlich	Galloway	GI-Wieseck/ Giessen	35396	Kot	ja	negativ	-	157	nein	negativ	-
199	17.12.03	2 a	weiblich	HF	Karben/ Wetteraukreis	61184	Kot	ja	Corona	-	159	DF blutig	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
200	18.12.03	4 w, +	männlich	HF	Ebsdorfergrund/ Marburg- Biedenkopf	35085	Darm	ja	negativ	negativ	160	B: DF; P: Enteritis	negativ	-
201	18.12.03	10 d	weiblich	HF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	97	-	negativ	-
202	23.12.03	6 d	männlich	DFV x HF	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	ja	negativ	-	16	Bronchopneumonie	negativ	-
203	23.12.03	-	weiblich	HF	Karben	61184	Kot	-	negativ	-	159	-	negativ	-
204	29.12.03	10 d	männlich	DFV	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	Bronchopneumonie	negativ	-
205	29.12.03	-	-	DFV	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	ja	Rota, Corona	-	16	B: DF	negativ	-
206	29.12.03	8 d	weiblich	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	164	Impfung Rota, Corona; Einzelfall	negativ	-
207	29.12.03	10 w	männlich	-	Burbach/ Siegen- Wittgenstein	57299	Kot	ja	negativ	-	151	seit 4 w DF; B: Rotavirusproblematik	negativ	-
208	30.12.03	10 d	männlich	RHF x Limousin	Hohenahr/ Lahn-Dill-Kreis	35644	Kot	ja	negativ	-	167	nein	negativ	-
209	30.12.03	8 d	weiblich	Dexter	Schmitten/ Hochtaunuskreis	61389	Kot	ja	negativ	-	156	per Sectio geboren	negativ	-
210	07.01.04	3 w	weiblich	HF	Albach/Giessen	35468	Kot	ja	Rota	-	162	rezidivierender DF, Kachexie, Enteritis	negativ	-
211	08.01.04	3 w, +	männlich	HF	Hilders/Fulda	36115	Darm	ja	negativ	negativ	168	Fieber, Schmerzen beim Aufstehen, Weißmuskelerkrankheit	negativ	-
212	08.01.04	-	-	-	Überherrn/ Saarlouis	66802	Kot	ja	negativ	-	169	-	negativ	-
213	08.01.04	-	-	-	Überherrn/ Saarlouis	66802	Kot	ja	Rota	-	169	-	negativ	-
214	12.01.04	3 m, +	weiblich	Mix	Reuth/ Vulkaneifel	54597	Darm	ja	negativ	negativ	170	schwarzer DF, ZNS- Symptome, 3 d später (Bestandsproblem)	negativ	-
215	14.01.04	8 w, +	weiblich	RHF	Merenberg/ Limburg- Weilburg	35799	Darm	ja	negativ	negativ	85	P: vergrößerte Darm- Inn., akute diffuse nekrotisch-haemo- lysiierende Enteritis	negativ	-
216	14.04.04	8 d	weiblich	HF	Ober- Seibertenrod/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	171	Bronchopneumonie, DF seit 5 d; B: DF	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
217	15.01.04	11 d	männlich	DFV	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	negativ	-	17	Trinkschwäche, DF blutig	negativ	-
218	22.01.04	1 w	-	-	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Kot	ja	negativ	-	172	B: wässriger DF, Leth- argie, Trinkschwäche	negativ	-
219	22.01.04	1 w	-	-	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Kot	ja	negativ	-	172	B: wässriger DF, Leth- argie, Trinkschwäche	negativ	-
220	22.01.04	1 w	-	-	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Kot	ja	negativ	-	172	B: wässriger DF, Leth- argie, Trinkschwäche	negativ	-
221	22.01.04	1 w	-	-	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Kot	ja	Rota	-	172	B: wässriger DF, Leth- argie, Trinkschwäche	negativ	-
222	22.01.04	1 w	-	-	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Kot	ja	negativ	-	172	B: wässriger DF, Leth- argie, Trinkschwäche	negativ	-
223	22.01.04	1 w	-	-	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Kot	ja	negativ	-	172	B: wässriger DF, Leth- argie, Trinkschwäche	negativ	-
224	22.01.04	6 d	männlich	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	Rota	-	141	Durchfall seit 3 d, Bronchopneumonie	positiv	-
225	22.01.04	8 d	weiblich	HF	Eschenrod/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	Rota	-	173	Durchfall seit 12 h, Bronchopneumonie	negativ	-
226	23.01.04	-	-	-	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	B: DF	negativ	-
227	23.01.04	-	-	-	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	Rota	-	141	B: DF	negativ	-
228	23.01.04	-	-	-	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	Picoma	-	141	B: DF	negativ	-
229	23.01.04	-	-	-	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	B: DF	negativ	-
230	23.01.04	8 d, +	weiblich	HF	Gemünden/ Waldeck- Frankenberg	35285	Darm	ja	negativ	negativ	174	P: akute, diffuse, kath. Enteritis und Abo- masitis (Blutungen)	negativ	-
231	26.01.04	5 d	-	Mix Fleisch- rassen	Krofdorf/ Giessen	35435	Kot	ja	negativ	-	175	Hypoglobulinämie infolge reduzierter Kolostrumaufnahme, seit 2 d DF	negativ	-
232	26.01.04	2 d	weiblich	HF	Münchhausen/ Marburg- Biedenkopf	35117	Kot	ja	negativ	-	176	Bronchopneumonie, Hinterendlage (Auszug), Frucht- wasserrespiration	negativ	-
233	27.01.04	-	-	-	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	Rota	-	93	B: Fertilitätsstörung	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzeltier	EM-Befund	Zellkultur/IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzeltier/Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
234	02.02.04	1 m, +	weiblich	HF	Jesberg/Schwalm-Eder-Kreis	34632	Darm	ja	Rota	negativ	177	P: kath. Enteritis	negativ	-
235	04.02.04	1 w	männlich	Mix	Buseck/Giessen	35418	Kot	ja	Rota	-	178	-	negativ	-
236	04.02.04	1 w	weiblich	Mix	Buseck/Giessen	35418	Kot	ja	Rota	-	178	-	negativ	-
237	05.02.04	6 d, +	männlich	HF	Homburg-Schadenbach/Vogelsbergkreis	35315	Darm	ja	negativ	negativ	179	keine Tränkeaufnahme, Festliegen; P: Abomasoenteritis	negativ	-
238	05.02.04	-	weiblich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	negativ	-	43	DF ab dem 10 d	negativ	-
239	05.02.04	10 d	weiblich	-	Bad Soden-Salmünster/Main-Kinzig-Kreis	63628	Kot	ja	Corona	-	180	B: DF bei Neugeborenen	negativ	-
240	22.01.04	4 d, +	weiblich	HF	Solms-Niederbiehl/Lahn-Dill-Kreis	35606	Kot	ja	negativ	negativ	181	Trinkschwäche; B: DF	negativ	-
241	22.01.04	5 a	weiblich	HF	Ludwigshausen/Rosenburg	36251	Kot	ja	negativ	-	182	B: DF (suppig), mäßige Futteraufnahme, zeitweilig Fieber, 5 Tiere +	negativ	-
242	09.02.04	-	-	-	Schwäbisch Gmünd/Ostalbkreis	73501	Kot	ja	negativ	-	183	-	negativ	-
243	11.02.04	10 d	männlich	RHF	Alverskirchen/Warendorf	48351	Kot	ja	negativ	-	184	seit 1 d DF	negativ	-
244	11.02.04	10 d, +	männlich	DFV	Wetter/Marburg-Biedenkopf	35083	Darm	ja	Rota	negativ	185	Apathie, Fieber	negativ	-
245	11.02.04	-	-	-	-	-	Kot	ja	negativ	-	186	B: DF	negativ	-
246	13.02.04	10 d, +	männlich	HF	Homburg/Ohm/Vogelsbergkreis	35315	Darm	ja	Rota	negativ	187	Hypothermie; P: Anämie, kath. Enteritis	negativ	-
247	16.02.04	0, +	weiblich	RHF	Lauterbach-Sichendorf/Vogelsbergkreis	36341	Darm	nein	n.d.	negativ	188	Abort im 8. m; B: vermehrt DF seit 2 m	negativ	-
248	16.02.04	4 d, +	weiblich	DFV	Buchena/Fulda	35232	Darm	ja	negativ	negativ	189	Krämpfe, Kolik, Festliegen; P: kath. Enteritis, Lymphadenitis simplex	negativ	-
249	17.02.04	2 d, +	männlich	HF	Heuchelheim/Giessen	35452	Darm	nein	negativ	negativ	99	Festliegen, ZNS-Ausfallserscheinungen; P: kath. Enteritis	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
250	18.02.04	8 d, +	männlich	Charolais	Münchholz- hausen/ Lahn-Dill-Kreis	35881	Darm	nein	negativ	negativ	190	keine Tränkeauf- nahme, Nasenaus- fluss, Husten, Streckkrampf, P: Peritonitis, Enteritis	negativ	-
251	27.02.04	8 a, +	weiblich	-	Schadental/ Vogelsbergkreis	36318	Darm	ja	negativ	negativ	191	hämorrhagische Enteritis, Stomatitis; P: diphteroid- nekrotisierende Enteritis, Endometritis	negativ	-
252	01.03.04	4 w, +	weiblich	RHF	Schwalmtal/ Vogelsbergkreis	36381	Darm	ja	negativ	negativ	192	Trinkschwäche, Hypoglykämie, Ödem im Kehlgangsbereich	negativ	-
253	01.03.04	9 d	weiblich	RHF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	Rota	-	65	-	negativ	-
254	05.03.04	2 m	weiblich	Limousin	Schlüchtern- Wallroth/Main- Kinzig-Kreis	36381	Kot	ja	negativ	-	193	kein Fieber, B: Lungensymptome und DF nach Zukauf	negativ	-
255	05.03.04	14 d	männlich	HF	Frankenberg/ Waldeck- Frankenberg	35066	Kot	ja	negativ	-	8	Trinkschwäche; B: DF, keine Mutterschutz- vakzine	negativ	-
256	08.03.04	8 d, +	weiblich	HF	Fronhausen/ Marburg- Biedenkopf	35112	Darm	ja	negativ	negativ	144	Husten; B: DF	negativ	-
257	08.03.04	13 d	weiblich	HF	Nidda/ Wetteraukreis	63667	Kot	ja	negativ	-	7	DF (blutig)	negativ	negativ
258	11.03.04	3 d, +	weiblich	HF	Romrod/ Vogelsbergkreis	36329	Darm	ja	Rota	negativ	201	B: DF; 1 d krank dann Exitus, P: Abomasoenteritis	negativ	negativ
259	11.03.04	2 d	männlich	HF	Romrod/ Vogelsbergkreis	36329	Kot	ja	Rota	-	201	-	negativ	negativ
260	15.03.04	14 d	weiblich	Galloway	Elbtal/Lim- burg-Weilburg	65627	Kot	ja	negativ	-	138	-	negativ	-
261	15.03.04	2 d	weiblich	DFV	Driedorf/ Lahn-Dill-Kreis	35759	Kot	ja	negativ	-	194	-	negativ	-
262	15.03.04	12 d	weiblich	HF	Driedorf/ Lahn-Dill-Kreis	35759	Kot	ja	negativ	-	103	-	negativ	-
263	16.03.04	11 d, +	männlich	DFV	Bürgstadt/ Mittlenberg	63927	Darm	nein	negativ	negativ	206	B: Kälber 3 d post partum +, Fieber (40°C), kein DF; P: ggrrd. Enteritis	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
264	18.03.04	2 d, +	weiblich	Charolais x DFV	Greifenstein/ Lahn-Dill-Kreis	35753	Darm	ja	Rota	negativ	39	B: Kälber 1 d post partum +, DF (blutig) Bronchopneumonie, Hypoglykämie; P: Enteritis	negativ	-
265	19.03.04	-	-	RHF	Reinheim/Lahn- Dill-Kreis	35759	Kot	ja	negativ	-	194	DF (wässrig)	negativ	-
266	22.03.04	-	-	-	Wurmlingen/ Tuttlingen	78573	Kot	ja	negativ	-	207	-	negativ	-
267	22.03.04	4 w, +	männlich	HF	Fronhausen/ Marburg- Biedenkopf	35112	Darm	ja	negativ	negativ	144	B: DF und Pneumonie; P: eitrig-abszessieren- de Pneumonie, Enteritis	negativ	-
268	23.03.04	5 d	-	-	Hellenhahn/ Westerkreis	56479	Kot	ja	negativ	-	199	B: DF	positiv	-
269	23.03.04	5 d	-	-	Hellenhahn/ Westerkreis	56479	Kot	ja	negativ	-	199	B: DF	negativ	-
270	23.03.04	5 d	-	-	Hellenhahn/ Westerkreis	56479	Kot	ja	negativ	-	199	B: DF	negativ	-
271	24.03.04	4 a, +	weiblich	Limousin	Wiehl/Ober- bergischer Kreis	51674	Darm	ja	negativ	Pestivirus (cp und ncp)	211	DF (blutig), SH- Erosionen; verstorben	negativ	negativ
272	24.03.04	2 m, +	-	Limousin	Wiehl/Ober- bergischer Kreis	51674	Darm	ja	negativ	Pestivirus (cp und ncp)	211	DF (blutig), SH- Erosionen; verstorben	negativ	negativ
273	25.03.04	14 d	weiblich	RHF	Buseck/Giessen	35418	Kot	ja	negativ	-	208	DF seit 1 d, Dyspnoe seit 2 d, hgrd. Omphalophlebitis	negativ	negativ
274	26.03.04	-	-	-	Meldorf/ Dithmarschen	25704	Kot	ja	Rota	-	209	-	positiv	-
275	26.03.04	13 d	weiblich	HF	Fronhausen/ Marburg- Biedenkopf	35112	Kot	ja	negativ	-	144	B: DF, schnelles Verenden	negativ	negativ
276	26.03.04	7 d, +	weiblich	-	Schotten/Vogels bergkreis	63679	Darm	ja	negativ	negativ	197	Exsikkose, Festliegen; P: Enteritis, Bronchopneumonie	negativ	negativ
277	26.03.04	5 d	weiblich	Angus	Gemünden/ Waldeck- Frankenberg	35329	Kot	ja	Rota	-	198	B: DF (wässrig- suppig) mit Schleimbeimengung	negativ	negativ
278	29.03.04	7 d	-	RHF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	64	-	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhö Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
279	30.03.04	4 d	-	HF	Hellenhahn/ Westerwaldkreis	56479	Kot	ja	negativ	-	199	B: DF	negativ	-
280	30.03.04	14 d	männlich	HF	Driedorf/ Lahn-Dill-Kreis	35759	Kot	ja	negativ	-	103	-	negativ	-
281	31.03.04	5 d	weiblich	RHF	Mücke-Sellinrod/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	64	-	negativ	-
282	01.04.04	8 d	-	-	Rainrod/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	195	DF seit 2. d; B: DF	negativ	-
283	01.04.04	1 w, +	männlich	Charolais	Erndebrück/ Siegen- Wittgenstein	57339	Darm	ja	negativ	negativ	196	B: Dyspnoe, DF, Exsikkose, Festliegen; P: Abomasoenteritis	negativ	-
284	02.04.04	14 d, +	männlich	Mix	Waldfischbach/ Südwestpfalz	67714	Darm	ja	negativ	negativ	200	B: DF; P: Enteritis, fibrinöse Polyarthrit	negativ	-
285	05.04.04	8 d	weiblich	HF	Linden/Giessen	35440	Kot	ja	negativ	-	24	hgnd. DF	negativ	-
286	06.04.04	-	-	-	Waldfischbach/ Südwestpfalz	67714	Kot	ja	negativ	-	200	B: Kälber erkrankten post partum an DF, therapieresistent, versterben nach kurzer Zeit	negativ	-
287	06.04.04	-	-	-	Waldfischbach/ Südwestpfalz	67714	Kot	ja	negativ	-	200	B: Kälber erkrankten post partum an DF, therapieresistent, versterben nach kurzer Zeit	negativ	-
288	06.04.04	6 d, +	weiblich	Charolais	Rehlingen-Für- weiler/Saarlouis	66780	Darm	ja	negativ	negativ	202	P: Enteritis	negativ	-
289	13.04.04	2 d	männlich	RHF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	64	DF blutig	negativ	-
290	14.04.04	1 m	weiblich	-	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	Trinkschwäche, teilweise DF	negativ	-
291	14.04.04	1 m	weiblich	-	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	Trinkschwäche, teilweise DF	negativ	-
292	19.04.04	3 a, +	weiblich	-	Katzwinkel-Sieg/ Altenkirchen	57581	Darm	ja	negativ	negativ	205	nach Kalben Fest- liegen, Euthanasie; P: Leberverfettung, kath. Enteritis	negativ	-
293	20.04.04	4 d	männlich	RHF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	64	B: DF	negativ	-
294	20.04.04	4 Wo	männlich	HF	Fronhausen/ Marburg- Biedenkopf	35112	Kot	ja	negativ	-	144	-	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
295	20.04.04	14 d, +	männlich	DA (rot)	Rudlos/ Vogelsbergkreis	36341	Darm	ja	negativ	negativ	204	P: kath. Abomaso- Enteritis, diophteroid- nekrotisierende Abomasitis	negativ	-
296	20.04.04	9 d, +	weiblich	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Darm	ja	negativ	negativ	141	Pansenfranken, Lab- magenverlagerung, dilatierter Magen; P: kath. Abomaso-Ent- eritis, Lungenatelekt- tase	negativ	-
297	21.04.04	1w	männlich	Angus Mix	Grünberg/ Giessen	35305	Kot	ja	negativ	-	203	grüner schleimiger Kot, mittelbreitig; Azidose, Hypoglykämie	negativ	-
298	22.04.04	2 w	weiblich	-	Hatter/ Westerwaldkreis	57644	Kot	ja	Rota	-	210	B: DF, hohe Morbidität (90%) und Letalität (50%)	negativ	-
299	22.04.04	2 w	weiblich	-	Hatter/ Westerwaldkreis	57644	Kot	ja	Rota	-	210	B: DF, hohe Morbidität (90%) und Letalität (50%)	negativ	-
300	22.04.04	2 w	weiblich	-	Hatter/ Westerwaldkreis	57644	Kot	ja	negativ	-	210	B: DF, hohe Morbidität (90%) und Letalität (50%)	negativ	-
301	18.03.04	4 d	männlich	Charolais	Greifenstein/ Lahn-Dill-Kreis	35753	Kot	ja	Rota	-	39	B: DF (blutig)	negativ	-
302	19.05.04	7 d	-	DFV	Elm/Main- Kinzig-Kreis	36381	Kot	ja	-	-	166	Kalb und Mutter DF	negativ	-
303	19.05.04	11 d	weiblich	RHF	Herborn/Lahn- Dill-Kreis	35745	Kot	ja	Rota	-	165	-	negativ	-
304	19.05.04	11 d	männlich	RHF	Herborn/Lahn- Dill-Kreis	35745	Kot	ja	Rota	-	165	-	negativ	-
305	25.05.04	-	-	-	Cheshire/ Großbritannien	-	Kot	ja	negativ	-	214	V.a. Rotavirus- Diarrhöe	negativ	-
306	25.05.04	12 d, +	männlich	-	Oipe/ Oipe	57462	Darm	ja	negativ	negativ	212	P: Polyarthrit, kath. Abomaso-Enteritis; vorher schlechte Tränkeaufnahme	negativ	-
307	25.05.04	20 m, +	weiblich	-	Ober-Mörlen/ Wetteraukreis	61239	Darm	ja	negativ	negativ	213	V.a. Vergiftung durch verpilzte Weidepflanzen	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
308	25.05.04	1 d, +	männlich	-	Ober-Mörlen/ Wetteraukreis	61239	Darm	ja	negativ	negativ	213	V.a. Vergiftung durch verpilzte Weidepflanzen	negativ	-
309	01.06.04	9 m	weiblich	-	Ehringshausen/ Lahn-Dill-Kreis	35630	Kot	ja	negativ	-	80	-	negativ	-
310	02.06.04	10 m, +	weiblich	HF	Ehringshausen/ Lahn-Dill-Kreis	35630	Darm	ja	negativ	negativ	80	-	negativ	-
311	04.06.04	-	-	-	Vöhl/Waldeck- Frankenberg	34516	Kot	ja	negativ	-	261	-	positiv	negativ
312	04.06.04	-	-	-	Vöhl/Waldeck- Frankenberg	34516	Kot	ja	negativ	-	261	-	positiv	negativ
313	04.06.04	-	-	-	Vöhl/Waldeck- Frankenberg	34516	Kot	ja	negativ	-	261	-	negativ	negativ
314	07.06.04	8 m	weiblich	-	Büdingen/ Wetteraukreis	63654	Kot	ja	negativ	-	2	B: DF bei Jungtieren, V.a. Corona	negativ	negativ
315	08.06.04	15 m, +	weiblich	DFV	Lauterbach- Moor/ Vogelsbergkreis	36341	Darm	ja	negativ	negativ	262	V.a. Mucosal Disease; P: kath. Abomaso- Enteritis	negativ	negativ
316	15.06.04	6 d	weiblich	RHF	Diemelsee/ Waldeck- Frankenberg	34519	Kot	ja	negativ	-	263	SH im Kot	negativ	-
317	28.06.04	1 a	weiblich	-	Amorbach/ Miltenberg	63916	Kot	ja	negativ	-	257	-	negativ	negativ
318	30.06.04	-	-	-	Prien/ Rosenheim	83209	Kot	ja	negativ	-	217	-	negativ	negativ
319	30.06.04	7 d, +	männlich	HF	Hirzenhain/ Wetteraukreis	63697	Darm	ja	negativ	negativ	109	Bronchopneumonie, DF; P: Pneumonie, Pleuritis, Enteritis	negativ	negativ
320	02.07.04	-	-	-	Saarlouis- Lisdorf/Saarlouis	66740	Kot	ja	Rota	-	255	V.a. Rota-/ Coronavirus-DF	negativ	negativ
321	05.07.04	2 d, +	weiblich	RHF	Ober- Seibertenrod/ Vogelsbergkreis	35327	Darm	ja	negativ	negativ	171	akuter Tod mit DF, P: kath. diffuse Enteritis	negativ	negativ
322	08.07.04	1 a	weiblich	-	Amorbach/ Miltenberg	63916	Kot	ja	negativ	-	256	-	negativ	negativ
323	13.07.04	10 d	weiblich	-	Kinzenbach/ Giessen	35452	Kot	ja	Rota	-	81	B: Kälber > 5 d, Festliegen, Trinkschwäche, DF	positiv	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
324	30.07.04	14 d	männlich	RHF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	-	-	64	DF gelb-grau mit Fibrin und Blut, Exsikkose	negativ	negativ
330	22.08.04	5 d	weiblich	RHF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	173	Omphalophlebitis	positiv	-
331	19.08.04	-	-	-	Dietzhöfetal/ Lahn-Dill-Kreis	35716	Kot	ja	negativ	-	250	-	negativ	negativ
332	24.08.04	6 w, +	männlich	Mix	Sinnthal-Oberzell/ Main-Kinzig- Kreis	36391	Darm	ja	negativ	negativ	251	symptomlos verstorben; P: diffuse Abomasoenteritis	negativ	negativ
333	27.08.04	14 d	männlich	Limousin x RHF	Hüttenberg/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	ja	negativ	-	219	-	negativ	-
334	30.08.04	3 w, +	männlich	HF	Waldbrunn/Lim- burg-Weilburg	65620	Darm	ja	negativ	negativ	259	B: nach 8.-10 d wäss- riger DF, versterben	negativ	-
335	30.08.04	3 w, +	männlich	RHF	Waldbrunn/Lim- burg-Weilburg	65620	Darm	ja	negativ	negativ	259	B: nach 8.-10 d wäss- riger DF, versterben	negativ	-
336	26.08.04	3 w, +	männlich	DFV	Rimbach/ Bergstrasse	64668	Darm	ja	negativ	negativ	258	ZNS-Symptomatik; P: Enteritis mit Sepsis	negativ	-
337	27.10.04	2d, +	männlich	Charolais	Derm/Lim- burg-Weilburg	65594	Darm	ja	negativ	negativ	254	P: Polyserositis, Enteritis	negativ	-
338	30.09.04	-	-	-	Rhede/ Emsland	26899	Kot	ja	negativ	-	252	-	negativ	-
339	06.10.04	10 d, +	männlich	HF	Gemünden/ Waldeck- Frankenberg	35285	Darm	ja	negativ	negativ	253	B: DF 8.-10. d, kein Fieber; P: Enteritis, Polyserositis	negativ	-
340	18.10.04	3 w, +	weiblich	HF	Weinheim/ Rhein-Neckar- Kreis	69469	Darm	ja	negativ	negativ	260	B: BVD/MD; P: akute diffuse kath. Enteritis	negativ	-
341	28.10.04	2 d	männlich	Charolais	Derm/Lim- burg-Weilburg	65594	Kot	ja	negativ	-	254	B: DF	negativ	-
342	14.12.04	1 m	männlich	-	Lauterbach/ Vogelsbergkreis	36341	Kot	ja	negativ	-	277	B: DF nach Zukauf mit erhebl. Verlusten	negativ	-
343	14.12.04	1 m	männlich	-	Lauterbach/ Vogelsbergkreis	36341	Kot	ja	negativ	-	277	B: DF nach Zukauf mit erhebl. Verlusten	negativ	-
344	14.12.04	1 m	männlich	-	Lauterbach/ Vogelsbergkreis	36341	Kot	ja	negativ	-	277	B: DF nach Zukauf mit erhebl. Verlusten	negativ	-
345	14.12.04	1 m	männlich	-	Lauterbach/ Vogelsbergkreis	36341	Kot	ja	negativ	-	277	B: DF nach Zukauf mit erhebl. Verlusten	negativ	-
346	14.12.04	1 m	männlich	-	Lauterbach/ Vogelsbergkreis	36341	Kot	ja	negativ	-	277	B: DF nach Zukauf mit erhebl. Verlusten	negativ	-
347	14.12.04	1 m	männlich	-	Lauterbach/ Vogelsbergkreis	36341	Kot	ja	negativ	-	277	B: DF nach Zukauf mit erhebl. Verlusten	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhö Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
348	14.12.04	6 w, +	männlich	HF	Lauterbach/ Vogelsbergkreis	36341	Darm	ja	negativ	Para- myxovirus	277	P: fibrinöse Pleuropneumonie, kath. Enteritis	negativ	-
349	14.12.04	6 w, +	männlich	HF	Lauterbach/ Vogelsbergkreis	36341	Darm	ja	negativ	Pestivirus (ncp)	277	P: fibrinöse Pleuropneumonie, kath. Enteritis	negativ	-
350	15.12.04	18 d	weiblich	DFV	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	94	B: DF bei Kälbern	negativ	-
351	18.11.04	4 d	weiblich	Mix	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	83	B: DF; Kälber sterben in den ersten 10 d	negativ	negativ
352	23.11.04	12 d, +	männlich	HF	Alsfeld/ Vogelsbergkreis	36304	Darm	ja	negativ	negativ	278	Bronchopneumonie, Anämie, Hypoglykämie	negativ	negativ
353	03.12.04	1 a	-	-	Rhede/ Emsland	26899	Kot	ja	negativ	-	279	-	negativ	negativ
354	17.12.04	9 d	männlich	-	Brilon/Hoch- sauerlandkreis	59929	Kot	ja	Rota, Corona	-	280	B: DF bei Neugeborenen	negativ	negativ
355	17.12.04	9 d	männlich	-	Brilon/Hoch- sauerlandkreis	59929	Kot	ja	Rota	-	280	B: DF bei Neugeborenen	negativ	negativ
360	27.12.04	-	-	-	Rhede/Emsland	26899	Kot	ja	negativ	-	283	-	negativ	negativ
361	28.12.04	7 d, +	weiblich	Limousin	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Darm	ja	Rota	negativ	282	P: akute diffuse kath. Enteritis mit Hinweisen auf Sepsis	negativ	negativ
362	28.12.04	7 d, +	weiblich	Limousin	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Darm	ja	Rota	negativ	282	P: akute diffuse kath. Enteritis mit Hinweisen auf Sepsis	negativ	negativ
363	31.12.04	6 d	männlich	Limousin -Mix	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	287	B: DF, Kalb erkrankt am 5. d	negativ	negativ
364	06.01.05	1 a	weiblich	-	Eggendorf/ Rottal-Inn	84307	Kot	ja	Rota	-	289	-	negativ	negativ
365	11.01.05	4 d	-	-	Hundstadt/ Hochtaunuskreis	61279	Kot	ja	Rota	-	292	seit 12-24 h an DF erkrankt, Blutbeimengungen	negativ	negativ
366	28.03.06	-	männlich	-	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	29	Kalb aus Sectio	negativ	
367	03.04.06	6 d	weiblich	DFV	Kirchhundem/ Olpe	57399	Kot	ja	Rota	-	381	-	negativ	
368	12.01.05	2 Wo	-	HF	Buseck/ Glessen	35418	Kot	ja	negativ	-	208	B: DF bei Kälbern, z.T. perakuter Verlauf	negativ	negativ
369	17.01.05	-	-	-	Haina/Waldeck- Frankenberg	35114	Kot	ja	negativ	-	225	B: DF bei Kälbern	negativ	fraglich

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhö Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
370	17.01.05	-	-	-	Haina/Waldeck-Franken- berg	35114	Kot	ja	negativ	-	225	B: DF bei Kälbern	negativ	negativ
371	17.01.05	-	-	-	Haina/Waldeck-Franken- berg	35114	Kot	ja	Rota	-	225	B: DF bei Kälbern	positiv	negativ
372	20.01.05	19 d	weiblich	DFV	Reinheim/Darm- stadt-Dieburg	64354	Kot	ja	Corona	-	194	B: DF bei Neugeborenen	negativ	-
373	20.01.05	19 d	männlich	DFV	Reinheim/Darm- stadt-Dieburg	64354	Kot	ja	negativ	-	194	B: DF bei Neugeborenen	negativ	-
374	25.01.05	4 d, +	männlich	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Darm	ja	negativ	negativ	173	P: Arthritis, Sepsis; B: DF bei Kälbern	negativ	-
375	25.01.05	7 d, +	männlich	DFV	Schwalmtal/ Vogelsbergkreis	36381	Darm	ja	negativ	negativ	192	Trinkschwäche, Vit. E- Selen-Mangel; P: Meningitis, Enteritis, Labmagenulzera	negativ	-
376	26.01.05	4 d	männlich	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	173	gelb-suppiger Kot; B: DF bei Kälbern	positiv	-
377	27.01.05	10 d, +	männlich	RHF	Mossautal/ Odenwaldkreis	64756	Darm	ja	negativ	negativ	302	B: DF bei Kälbern; P: kath. Enteritis	negativ	negativ
378	27.01.05	6 d	männlich	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	Rota	-	141	B: DF bei Kälbern	negativ	negativ
379	27.01.05	11 d	männlich	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	173	Behandlung mit Halocur, Ver- schlechterung 10. d	negativ	negativ
380	01.02.05	10 d	weiblich	HF	Ebsdorfergrund/ Marburg- Biedenkopf	35085	Kot	ja	negativ	-	303	P: akute diffuse fibrinöse Enteritis	negativ	negativ
381	02.02.05	14 d, +	weiblich	DFV	Heroldsbach/ Forchheim	91336	Darm	ja	negativ	negativ	304	P: akute diffuse kath. Enteritis, diphtheroide Ruminitis	negativ	negativ
382	04.02.05	4,5 a	weiblich	HF	Erfurtshausen/ Marburg- Biedenkopf	35287	Kot	ja	negativ	-	305	P: akute diffuse kath. Enteritis	negativ	negativ
383	07.02.05	6 w	-	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	173	DF mit Blutbeimengungen	negativ	negativ
384	07.02.05	2 w	weiblich	Jersey	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	Rota	-	173	Trinkschwäche	negativ	negativ
385	08.02.05	6 w, +	weiblich	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Darm	ja	negativ	negativ	173	P: akute diff. kath. Abomasoenteritis, kath.-eitrige Spitzen- lappennpneumonie	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
386	08.02.05	3 w, +	weiblich	HF	Mengerskirchen/ Limburg- Weilburg	35794	Darm	ja	negativ	negativ	78	P: Exsikkose, Abomasoenteritis, Tarsitis, Rhinitis	positiv	negativ
387	08.02.05	3 w, +	weiblich	HF	Mengerskirchen/ Limburg- Weilburg	35794	Darm	ja	negativ	negativ	78	P: Exsikkose, Abomasoenteritis, Tarsitis, fibrinöse Auflagerungen Oesophagus	negativ	negativ
388	09.02.05	8 d	-	HF	Lindenberg/ Schwalm-Eder- Kreis	34281	Kot	ja	negativ	-	306	B: DF	negativ	negativ
389	10.02.05	18 d, +	weiblich	Jersey	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Darm	ja	negativ	negativ	173	P: Enteritis	negativ	negativ
390	11.02.05	2 d	-	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	B: DF bei Kälbern mit hoher Morbidität	negativ	negativ
391	11.02.05	2 d	-	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	B: DF bei Kälbern mit hoher Morbidität	negativ	negativ
392	11.02.05	2 d	-	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	B: DF bei Kälbern mit hoher Morbidität	negativ	negativ
393	11.02.05	2 d	-	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	B: DF bei Kälbern mit hoher Morbidität	negativ	negativ
394	11.02.05	2 d	-	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	B: DF bei Kälbern mit hoher Morbidität	negativ	negativ
395	11.02.05	2 d	-	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	B: DF bei Kälbern mit hoher Morbidität	negativ	negativ
402	15.02.05	2 a	weiblich	-	Kefenrod/ Wetteraukreis	63699	Kot	ja	negativ	-	311	Vor 1 Wo gekalbt, Kalb obB; V.a. Rota, Corona	negativ	-
403	17.02.05	1 a	weiblich	-	Gefell/ Vulkaneifel	54552	Kot	ja	negativ	-	312	-	negativ	-
404	18.02.05	8 d	weiblich	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	173	B: DF	negativ	-
405	23.02.05	1 a	weiblich	-	Gochsheim/ Karlsruhe	76703	Kot	ja	negativ	-	313	-	negativ	-
406	23.02.05	-	-	-	Eiterfeld/Fulda	36132	Kot	ja	negativ	-	314	-	negativ	-
407	23.02.05	5 d, +	männlich	HF	Villmar/Lim- burg-Weilburg	65606	Darm	ja	negativ	negativ	315	P: akute diffuse kath. Abomasoenteritis	negativ	-
408	25.02.05	1 m	weiblich	HF	Brensbach- Wallbach/ Odenwaldkreis	64395	Kot	ja	negativ	-	285	seit 2 d DF und Anorexie, Atemnebengeräusche	negativ	-
409	25.02.05	2 w	weiblich	HF	Brensbach- Wallbach/ Odenwaldkreis	64395	Kot	ja	negativ	-	285	seit 2 d DF bei erhaltenem Appetit	positiv	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
410	04.03.05	2 w, +	männlich	DFV	Michelstadt/ Odenwaldkreis	64720	Darm	ja	negativ	negativ	325	P: fibrinöse Poly- arthritis, kath.-eitrige Bronchopneumonie, Omphalophlebitis, Lymphadenitis, Enteritis	negativ	-
411	07.03.05	10 d	weiblich	DFV	Hirzenhain/ Wetteraukreis	63697	Kot	ja	negativ	-	323	dünnbreig-suppiger Kot, zementfarben	negativ	-
412	07.03.05	16 d, +	männlich	DFV x Limousin	Schlüchtern- Wallroth/Main- Kinzig-Kreis	36381	Darm	ja	negativ	negativ	324	P: akute, diffuse, kath. Enteritis; eitrige Bronchitis	negativ	-
413	08.03.05	9 a	weiblich	DFV	Alsfeld/ Vogelsbergkreis	36304	Kot	ja	negativ	-	326	B: DF trotz Impfung mit Scourgarce 3	negativ	-
414	09.03.05	1 w	-	-	Rudlos/ Vogelsbergkreis	36341	Kot	ja	negativ	-	204	DF bei allen Jungtieren	negativ	-
415	10.03.05	-	-	DFV	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	Rota	-	43	nein	negativ	-
416	10.03.05	-	-	-	Lich/Giessen	35423	Kot	ja	Rota	-	327	rezidivierender DF	negativ	-
417	10.03.05	8d	männlich	HF	Kirtorf- Oberseen/ Vogelsbergkreis	36320	Kot	ja	negativ	-	328	P: akute diffuse kath. Enteritis	negativ	-
418	10.03.05	10 d	weiblich	RHF	Neustadt/Mar- burg-Biedenkopf	35279	Kot	ja	Rota	-	329	suppig-gelber Kot	negativ	-
419	10.03.05	8 d	männlich	RHF	Neustadt/Mar- burg-Biedenkopf	35279	Kot	ja	Rota	-	329	suppig-gelber Kot	negativ	-
425	14.03.05	3 w, +	männlich	DFV	Alsfeld- Billertshausen/ Vogelsbergkreis	36304	Darm	ja	negativ	negativ	330	festliegend in Brustlage, dünnbreig- grauer Kot, T: 34,3°C	negativ	-
426	05.04.05	10 d	-	-	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Kot	ja	negativ	-	141	DF 2.-10. d	negativ	-
427	22.03.05	1d, +	weiblich	HF	Linden/Giessen	35440	Darm	ja	negativ	negativ	62	B: DF und Kalbersterben; P: kath. Enteritis	negativ	-
428	21.03.05	9d, +	männlich	HF	Büdingen/ Wetteraukreis	63654	Kot	ja	negativ	negativ	334	plötzlich verstorben nach Umstellung auf Milchaustauscher; P: Abomasoenteritis, Spitzenlappen verdichtet	negativ	-
429	24.03.05	1 w	Kalb	Fleisch- mix	Bensheim/ Bergstrasse	64625	Kot	ja	negativ	-	331	B: DF; Muttertierimpfung Rota/Corona	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
430	24.03.05	1 w	Kalb	Fleisch- mix	Bensheim/ Bergstrasse	64625	Kot	ja	negativ	-	331	B: DF; Muttertierimpfung Rota/Corona	negativ	-
431	30.03.05	10 d	männlich	Galloway	Angelburg/ Marburg- Biedenkopf	35719	Kot	ja	negativ	-	332	P: akute diffuse kath. Abomasoenteritis, Lymphadenitis simplex	negativ	-
432	30.03.05	3 d	männlich	Salair x DFV	Beilstein/ Lahn-Dill-Kreis	35735	Kot	ja	negativ	-	333	P: kath. Abomaso- enteritis mit Blut- austritt, verdichtete Lungenläppchen, Lymphadenitis simplex	negativ	-
433	30.03.05	3 d	weiblich	Salair x DFV	Beilstein/ Lahn-Dill-Kreis	35735	Kot	ja	negativ	-	333	P: kath. Abomaso- enteritis mit Blut- austritt, verdichtete Lungenläppchen, Lymphadenitis simplex	negativ	-
434	04.04.05	2 d, +	weiblich	DFV	Gedern/ Wetteraukreis	63688	Darm	ja	negativ	negativ	141	Aufblähung, Nabel- entzündung, Lungensymptome; P: Bronchopneumonie, Peritonitis	negativ	-
435	05.04.05	-	-	-	Wächtersbach/ Main-Kinzig- Kreis	63607	Kot	ja	Rota	-	17	mehrere Kälber betroffen	negativ	-
436	06.04.05	2 a	weiblich	HF	Borken/ Borken	34582	Kot	ja	negativ	-	335	Lahnheit hinten links; Klauenspitzennekrose, Ballenabszeß; P: Lunge gestaut	negativ	-
437	11.04.05	2 d	weiblich	Rotvieh	Dautphetal/Mar- burg-Biedenkopf	35232	Kot	ja	negativ	-	336	-	negativ	-
438	13.04.05	1d, +	männlich	-	Bad Soden-Sal- münster/Main- Kinzig-Kreis	63628	Darm	ja	negativ	negativ	316	P: Enteritis	negativ	-
439	24.04.05	4 d	weiblich	Charolais	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	Rota	-	105	DF katarrhalisch	negativ	-
440	25.04.05	2 m	weiblich	Charolais	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	negativ	-	105	Metatarsalfrakturen; plötzlich verstorben	negativ	-
441	04.05.05	1 w	weiblich	HF	Linden/Giessen	35440	Kot	ja	negativ	-	62	B: DF bei Kälbern	negativ	negativ
442	04.05.05	1 w	weiblich	HF	Linden/Giessen	35440	Kot	ja	negativ	-	62	B: DF bei Kälbern	negativ	negativ
443	04.05.05	1 w	weiblich	HFRB	Grünberg/Lim- burg-Weilburg	35305	Kot	ja	Rota	-	317	seit 2 d wässriger DF	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
444	04.05.05	2 d	männlich	RHF	Kinzenbach/ Giessen	35452	Kot	ja	negativ	-	81	hgrd. DF, HKT = 0,21	negativ	negativ
445	04.05.05	10 d	weiblich	HF	Rüthen/Soest	59602	Kot	ja	negativ	-	318	-	negativ	negativ
446	04.05.05	2 w	männlich	HF	Rüthen/Soest	59602	Kot	ja	negativ	-	318	-	negativ	negativ
447	09.05.05	4 d	-	-	Isselburg/Borken	46419	Kot	ja	negativ	-	320	B: DF	negativ	-
448	10.05.05	18 d, +	weiblich	Charolais	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Darm	ja	negativ	negativ	105	Omphalitis; P: Abomasoenteritis	negativ	-
449	10.05.05	9 w, +	weiblich	Charolais	Hollich/ Rhein-Hunsrück- Kreis	56288	Darm	ja	negativ	negativ	321	B: Omphalitis, Polyarthrit; P: eitriges Carpitis, kath. Enteritis	negativ	-
450	11.05.05	5d, +	-	-	Isselburg/Borken	46419	Kot	ja	negativ	-	322	B: DF	negativ	negativ
451	18.05.05	3 m, +	männlich	Limousin	Hohenahr/ Lahn-Dill-Kreis	35644	Darm	ja	negativ	negativ	319	V.a. CCN, Zwilling ebenfalls verstorben; P: Abomasoenteritis, diphtheroide Oesophagi- tis, Arthritis	negativ	negativ
452	31.05.05	5d, +	weiblich	-	Gemünden/ Waldeck- Frankenberg	35285	Darm	ja	negativ	negativ	88	B: DF bei Kälbern mit hohen Verlusten	negativ	negativ
453	19.05.05	2 m, +	männlich	HF	Leidenhofen/ Marburg- Biedenkopf	35085	Darm	ja	negativ	negativ	342	B: DF; path.: ulcerative Stomatitis, kath. Enteritis, fibrinöse Polyarthrit	negativ	-
454	14.07.05	5 d	weiblich	HF	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	173	B: DF	negativ	-
455	14.06.05	-	-	-	Bayerisch Gmain/Berchtes- gadener Land	83457	Kot	ja	negativ	-	343	-	negativ	negativ
456	05.09.05	1 a	weiblich	-	Szerencs/ Ungarn	-	Kot	ja	negativ	-	345	-	negativ	-
457	16.06.05	3d, +	weiblich	HF	Glauburg/ Wetteraukreis	63695	Darm	ja	negativ	negativ	341	B: DF ab 2. d, sterben ab 3. d (bereits 5. Kalb)	negativ	negativ
458	20.06.05	-	-	-	Schweinitz/ Anhalt-Zerbst	39279	Kot	ja	negativ	-	344	-	positiv	negativ
459	20.06.05	-	-	-	Schweinitz/ Anhalt-Zerbst	39279	Kot	ja	negativ	-	344	-	negativ	negativ
460	20.06.05	-	-	-	Schweinitz/ Anhalt-Zerbst	39279	Kot	ja	negativ	-	344	-	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
461	20.06.05	-	-	-	Schweinitz/ Anhalt-Zerbst	39279	Kot	ja	negativ	-	344	-	negativ	negativ
462	24.06.05	4 d, +	weiblich	Galloway	Elbtal/ Limb- burg- Weilburg	65627	Darm	ja	negativ	negativ	338	ZNS-Symptomatik; P: blutige Gelenke, Enteritis	negativ	-
463	18.07.05	10 d	weiblich	HF	Neuhof- Tiefengruben/ Fulda	36119	Kot	ja	negativ	-	339	DF wässrig-suppig, ockergelb; B: DF	negativ	-
464	19.07.05	-	-	-	Pecholdsdorf/ Österreich	-	Kot	ja	negativ	-	340	-	negativ	-
465	22.07.05	13 d, +	weiblich	HF	Hirzenhain/ Wetteraukreis	63697	Darm	ja	negativ	negativ	109	Krämpfe; P: akute diffuse kath. Enteritis	negativ	-
466	01.08.05	-	weiblich	-	Ludwigsburg/ Ludwigsburg	71611	Kot	ja	Rota	-	337	-	negativ	positiv
467	01.08.05	-	weiblich	-	Ludwigsburg/ Ludwigsburg	71611	Kot	ja	Rota	-	337	-	negativ	negativ
468	01.08.05	-	weiblich	-	Ludwigsburg/ Ludwigsburg	71611	Kot	ja	negativ	-	337	-	negativ	negativ
469	09.08.05	1 d	weiblich	HF	Neuhof- Tiefengruben/ Fulda	36119	Kot	ja	negativ	-	339	B: DF bei Kälbern am Ende der 1. w	negativ	negativ
470	09.08.05	2 w	männlich	HF	Neuhof- Tiefengruben/ Fulda	36119	Kot	ja	negativ	-	339	B: DF bei Kälbern am Ende der 1. w	negativ	negativ
471	02.09.05	1 w	-	-	Niederstaufen/ Kaiserslautern	66879	Kot	ja	negativ	-	346	vorbehandelt mit P.N. 350	negativ	-
472	11.10.04	1 w	-	-	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	173	-	negativ	-
473	11.10.04	1 w	-	-	Schotten/ Vogelsbergkreis	63679	Kot	ja	negativ	-	173	-	negativ	-
474	13.10.04	10 d	männlich	HF	Weinheim/ Rhein-Neckar- Kreis	69469	Kot	ja	negativ	-	260	-	negativ	-
475	13.10.04	10 d	männlich	HF	Weinheim/ Rhein-Neckar- Kreis	69469	Kot	ja	negativ	-	260	-	negativ	-
476	23.09.05	2 w	weiblich	DFV	Wabern/ Schwalm-Eder- Kreis	34590	Kot	ja	negativ	-	365	B: DF	negativ	-
477	23.09.05	2 w	weiblich	DFV	Wabern/ Schwalm-Eder- Kreis	34590	Kot	ja	Rota	-	365	B: DF	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
478	04.10.05	4,5 a	weiblich	DFV	Michelstadt/ Odenwaldkreis	64720	Kot	ja	negativ	-	366	Anorexie, wässriger DF, gerötete Schleimhäute	negativ	-
479	19.10.05	6 m, +	weiblich	DFV	Schlüchtern/ Main-Kinzig- Kreis	36381	Darm	ja	negativ	Pestivirus (ncp) (Darm)	371	Bronchopneumonie, Trichophytie, Kümmer; P: Enteritis, kath.- eitrige Broncho- pneumonie	negativ	-
480	21.10.05	6 w, +	männlich	Limousin -Mix	Bestwig/ Hochsauerland- kreis	59909	Kot	nein	negativ	-	372	kolikartige Krämpfe, haarlose Stellen; P: Meningitis, Labmagenulcus, Abomasoenteritis, Polyarthritits	negativ	-
481	31.10.05	-	-	-	Gefell./ Vulkaneifel	54552	Kot	ja	negativ	-	312	-	negativ	-
482	10.11.05	-	-	-	Schnefeld/ Pinneberg	22869	Kot	ja	negativ	-	374	-	negativ	-
483	14.11.05	1 m, +	weiblich	Charolais x DFV	Homburg/ Vogelsbergkreis	35315	Darm	ja	negativ	negativ	367	P: kath. Enteritis, erosive Stomatitis	negativ	-
484	28.11.05	3 a, +	weiblich	HF	Giessen/Giessen	35392	Darm	nein	negativ	negativ	264	P: haemorrhagische Enteritis, Mastitis, Endometritis	negativ	-
485	06.12.05	10 d, +	weiblich	RHF	Gemünden/ Waldeck- Frankenberg	35285	Darm	ja	negativ	negativ	368	Fieber (40°C), Seitenlage; P: kath. Enteritis	negativ	-
486	07.12.05	7 m	weiblich	Charolais	Rabenau/ Giessen	35466	Kot	nein	negativ	-	369	P: Enteritis, Rhinitis/Tracheitis	negativ	-
487	07.12.05	3 d	weiblich	HF	Giessen/Giessen	35398	Kot	ja	negativ	-	370	Pansentinken, metab. Azidose, Hypogly- kämie; P: fibrinös- eitrige Peritonitis, kath. Enteritis	positiv	-
488	16.12.05	11 d	männlich	RHF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	373	nein	negativ	-
489	20.12.05	2 w	weiblich	DFV	Großenluder/ Fulda	36137	Kot	ja	negativ	-	360	trinkt nicht mehr, Temperaturabfall, festliegend; DF hell und breiig	negativ	-
490	20.12.05	2 a, +	weiblich	Limousin	Schlitz-Willows/ Vogelsbergkreis	36110	Darm	ja	negativ	negativ	375	rezidivierender DF, Kümmern	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
491	22.12.05	2 a	weiblich	-	Hemer/ Märkischer Kreis	58675	Kot	ja	negativ	-	348	B: wässrig-blutiger DF nach Impfung gegen BVD/MD; 1 Rind verstorben	negativ	-
492	22.12.05	4 a	weiblich	-	Hemer/ Märkischer Kreis	58675	Kot	ja	negativ	-	348	B: wässrig-blutiger DF nach Impfung gegen BVD/MD; 1 Rind verstorben	negativ	-
493	22.12.05	2 a	weiblich	-	Hemer/ Märkischer Kreis	58675	Kot	ja	negativ	-	348	B: wässrig-blutiger DF nach Impfung gegen BVD/MD; 1 Rind verstorben	negativ	-
494	22.12.05	1 a	weiblich	-	Hemer/ Märkischer Kreis	58675	Kot	ja	negativ	-	348	B: wässrig-blutiger DF nach Impfung gegen BVD/MD; 1 Rind verstorben	negativ	-
495	23.12.05	2 w, +	männlich	DFV	Zeithofs/ Bad Kissingen	97799	Darm	ja	negativ	negativ	347	B: DF; P: akute diffuse kath. Abomaso- enteritis	negativ	-
496	22.12.05	1 w	weiblich	DFV	Zeithofs/ Bad Kissingen	97799	Kot	ja	Rota	-	347	B: DF	negativ	negativ
497	03.01.06	11 d	-	-	Klein-Lieder/ Fulda	36137	Kot	ja	negativ	-	360	B: 30% Kälberverluste wegen DF in der 2. w	negativ	negativ
498	03.01.06	11 d	-	-	Klein-Lieder/ Fulda	36137	Kot	ja	negativ	-	360	B: 30% Kälberverluste wegen DF in der 2. w	negativ	negativ
499	03.01.06	11 d	-	-	Klein-Lieder/ Fulda	36137	Kot	ja	negativ	-	360	B: 30% Kälberverluste wegen DF in der 2. w	negativ	negativ
500	03.01.06	4 d	-	-	Herbststein/ Vogelsbergkreis	36358	Kot	ja	SRSV	-	361	B: 10% Kälberverluste wegen DF in der 1. w	negativ	negativ
501	03.01.06	4 d	-	-	Herbststein/ Vogelskreis	36358	Kot	ja	negativ	-	361	B: 10% Kälberverluste wegen DF in der 1. w	negativ	-
502	03.01.06	4 d	-	-	Herbststein/ Vogelskreis	36358	Kot	ja	negativ	-	361	B: 10% Kälberverluste wegen DF in der 1. w	negativ	negativ
503	09.01.06	5 d	-	Charolais	Rabenau/ Giessen	35466	Kot	ja	Rota	-	67	B: DF	negativ	-
504	09.01.06	3 d, +	männlich	DFV	Michelstadt/ Odenwaldkreis	64720	Darm	ja	negativ	Para- myxovirus	366	P: kath. Abomaso- enteritis, Exsikkose, vergrößerte Lunge	negativ	-
505	22.03.06	1 a	weiblich	-	Wagenfeld/ Diepholz	49419	Kot	ja	Corona	-	380	-	negativ	-
506	20.01.06	1 a	-	-	Osnabrück/ kreisfreie Stadt	49074	Kot	ja	negativ	-	376	-	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhö Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel- tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
507	20.01.06	1 w	-	-	Kirchhunden/ Olpe	57399	Kot	ja	negativ	-	350	gute Tränkeaufnahme	negativ	-
508	27.01.06	2 m	weiblich	HF	Homburg/ Vogelsbergkreis	35315	Kot	ja	negativ	-	351	-	negativ	-
509	30.01.06	2 w	männlich	HF	Alsfeld/ Vogelsbergkreis	36304	Kot	ja	Rota	-	278	-	negativ	-
510	30.01.06	11 d	männlich	DFV	Alsfeld/ Vogelsbergkreis	36304	Kot	ja	Corona	-	278	-	negativ	-
511	30.01.06	2 w	männlich	DFV	Kirchhunden/ Olpe	57399	Kot	ja	Rota	-	350	-	negativ	-
512	30.01.06	1 w	weiblich	DFV	Kirchhunden/ Olpe	57399	Kot	ja	Corona	-	350	-	negativ	-
513	30.01.06	11 d	weiblich	HF	Altenhasungen/ Kassel	34466	Kot	ja	negativ	-	349	B: DF bei Kälbern in der 1. w	negativ	-
514	30.01.06	10 d	männlich	HF	Altenhasungen/ Kassel	34466	Kot	ja	Rota	-	349	B: DF bei Kälbern in der 1. w	negativ	-
515	31.01.06	-	-	-	Gefell/ Vulkaneifel	54552	Kot	ja	negativ	-	352	-	negativ	-
516	31.01.06	10 d, +	männlich	HF	Altenhasungen/ Kassel	34466	Darm	ja	-	negativ	349	B: DF bei Kälbern in der 1. w	negativ	-
517	31.01.06	11 d	männlich	Limousin	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	11	P: akute diffuse kath. Enteritis	negativ	-
518	03.02.06	7 d, +	männlich	Galloway	Breitenbach/ Marburg- Biedenkopf	35236	Darm	ja	-	negativ	353	schlechte Tränkeauf- nahme; P: akute diffuse kath. Enteritis	negativ	negativ
519	07.02.06	7 w, +	weiblich	DFV	Brombachtal/ Odenwaldkreis	64753	Darm	ja	-	negativ	358	4. Kalb innerhalb 14 d; P: fibrinöse Poly- arthritis, Ulzera im Pansen; diffuse, kath. Enteritis	negativ	negativ
520	08.02.06	10 d, +	männlich	Fleisch- rasse	Bischoffen/ Lahn-Dill-Kreis	35649	Darm	ja	negativ	negativ	256	3. Kalb innerhalb von 14 d gestorben; vor 2 a Rota-/Corona Muttertierimpfung; P: diffuse kath. Abomasoenteritis	negativ	-
521	08.02.06	2,5 a	weiblich	RHF	Mossautal/ Odenwaldkreis	64756	Kot	ja	negativ	-	357	seit 2 d Freßunlust; DF mit Blutbe- mengungen, Fieber (41°C)	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzel- tier	EM- Befund	Zell- kultur/ IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzel tier/ Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
522	09.02.06	2 d	weiblich	HF x RHF	Linden/Giessen	35440	Kot	ja	negativ	-	62	B: DF; Antikörper gegen Pestiviren; früher bestandsspezifische E. coli-Vakzine	negativ	negativ
523	10.02.06	7 d	-	-	Grevembroich/ Rhein-Kreis Neuss	41515	Kot	ja	negativ	-	355	-	negativ	negativ
524	10.02.06	1 w	-	-	Naundorf/ Torgau-Oschatz	04769	Kot	ja	negativ	-	354	B: DF; V.a. Rota/Corona	negativ	negativ
525	10.02.06	2 w	-	-	Naundorf/ Torgau-Oschatz	04769	Kot	ja	negativ	-	354	B: DF; V.a. Rota/Corona	negativ	negativ
526	10.02.06	3 w	-	-	Naundorf/ Torgau-Oschatz	04769	Kot	ja	negativ	-	354	B: DF; V.a. Rota/Corona	negativ	negativ
527	06.01.06	1 w, +	männlich	DFV	Kalbach/Fulda	36148	Darm	ja	negativ	negativ	359	P: Enteritis	negativ	-
528	19.12.05	1 w, +	weiblich	Charolais	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Darm	ja	negativ	negativ	361	P: Abomasoenteritis, Polyarthritis	negativ	-
529	19.12.05	1 w, +	weiblich	Charolais	Herbstein/ Vogelsbergkreis	36358	Darm	ja	negativ	negativ	361	P: Abomasoenteritis, Polyarthritis	negativ	-
530	14.02.06	9 d	weiblich	HF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	97	DF seit 3 d	negativ	-
531	16.02.06	1 a	weiblich	-	Eggenfelden/ Rottal-Inn	84307	Kot	ja	Rota	-	289	-	negativ	-
532	22.02.06	10 d	weiblich	RHF	Hatter/ Westenwaldkreis	57644	Kot	ja	negativ	-	210	vorbehandelt mit Halocur, Marbocyl	negativ	-
533	24.02.06	2 w	-	DFV	Birsten/Main- Kinzig-Kreis	63633	Kot	ja	Rota	-	107	B: DF und Bronchopneumonie	negativ	negativ
534	02.03.06	4 w, +	weiblich	Mix	Wehrheim/ Hochtaunuskreis	61273	Darm	ja	negativ	negativ	362	P: Enteritis; eitrig- abszessierende Pneumonie	negativ	negativ
535	03.03.06	5 d, +	männlich	HF	Altenstadt/ Wetteraukreis	63674	Darm	ja	negativ	negativ	33	P: Enteritis	negativ	negativ
536	06.03.06	8 d	-	-	Oberseiberten- rod/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	negativ	-	363	B: DF bei Kälbern in der 1. w	negativ	negativ
537	06.03.06	10 d	-	HF	Lindenbergr/ Schwalm-Eder- Kreis	34281	Kot	ja	negativ	-	306	B: DF	negativ	negativ
538	06.03.06	14 d, +	männlich	-	Merenberg/ Limburg- Weilburg	35799	Darm	ja	negativ	negativ	364	ZNS-Symptomatik; P: akute diffuse kath. Enteritis	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhö Einzel-tier	EM-Befund	Zellkultur/IF	Bestand - Nr.	sonstige Symptome Einzeltier/Bestandsprobleme	PCR NoV	PCR SaV
539	13.03.06	1 a	weiblich	HF	Ramsloh/ Cloppenburg	26683	Kot	ja	negativ	-	377	-	negativ	-
540	17.03.06	14 d, +	weiblich	Jersey	Berschweiler/ Birkenfeld	55777	Darm	ja	negativ	negativ	378	keine Tränkeaufnahme, Festlegen; P: akute diffuse kath. Enteritis	negativ	-
541	17.03.06	1 m	weiblich	-	Waldmichelbach/ Bergstrasse	69479	Kot	ja	negativ	-	379	B: DF bei Kälbern	negativ	-
542	04.04.06	1 m	weiblich	-	Szerencs./ Ungarn	-	Kot	ja	negativ	-	345	-	negativ	-
543	04.04.06	1 m	weiblich	-	Szerencs/ Ungarn	-	Kot	ja	negativ	-	345	-	negativ	-
544	04.04.06	1 m	weiblich	-	Szerencs/ Ungarn	-	Kot	ja	negativ	-	345	-	negativ	-
545	04.04.06	1 m	weiblich	-	Szerencs/ Ungarn	-	Kot	ja	negativ	-	345	-	negativ	-
546	04.04.06	1 m	weiblich	-	Szerencs/ Ungarn	-	Kot	ja	negativ	-	345	-	negativ	-

9.1.2 Rohdaten Rind - Fragebogenaktion

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft	PLZ	Material	Diarrhö Einzel-tier	Bestand - Nr.	Anzahl Tiere	Betriebsform/ Haltung Kälber	sonstige Symptome Einzeltier/ Probleme Bestand	PCR NoV	PCR SaV
015	25.03.03	3 w	männlich	RHF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	6	8	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	metabol. Azidose	negativ	negativ
016	25.03.03	3 w	weiblich	HF	Nidda/ Wetteraukreis	63667	Kot	nein	7	50	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Hernia umbilicalis	negativ	negativ
017	26.03.03	7 d	-	Mix	Giesen/Giessen	35398	Kot	ja	4	-	-	nein	negativ	negativ
018	01.04.03	7 d	weiblich	Limousin	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	nein	11	15	Mutterkuhhaltung	Hernia umbilicalis	negativ	negativ
019	01.04.03	2 w	weiblich	Charolais	Gründau/Main-Kinzig-Kreis	63584	Kot	ja	12	20	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Hernia umbilicalis, Omphalophlebitis	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft	PLZ	Material	Diarhöe Einzeltier	Bestand - Nr.	Anzahl Tiere	Betriebsform/ Haltung Kälber	sonstige Symptome Einzeltier/ Probleme Bestand	PCR NoV	PCR SaV
020	01.04.03	2 w	männlich	DFV	Völkersleier/ Bad Kissingen	97997	Kot	ja	13	24	Kälberaufzucht; Einzelh., Einstreu	Omphalophlebitis, Labmagenblutung, Wundinfektion	negativ	negativ
021	01.04.03	3 w	weiblich	DFV	Reinheim/Darmstadt-Dieburg	64354	Kot	ja	14	80	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Bronchopneumonie; B: DF	negativ	negativ
022	01.04.03	2 m	männlich	DFV	Waldmichelbach/ Bergstrasse	69483	Kot	ja	15	80	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Anämie	negativ	negativ
023	01.04.03	3 w	weiblich	DFV	Reinheim/Darmstadt-Dieburg	64354	Kot	ja	14	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Exanthem, Haarausfall; B: DF	negativ	negativ
024	02.04.03	1 m	männlich	DFV	Wächtersbach/ Main-Kinzig-Kreis	63607	Kot	ja	17	-	-	Trinkschwäche; B: DF	negativ	negativ
025	02.04.03	1 w	weiblich	Charolais	Ramstadt/Darmstadt-Dieburg	64368	Kot	nein	18	-	-	Trinkschwäche, Exsikkose	negativ	negativ
026	02.04.03	2 w	männlich	DFV	Königsberg/ Giessen	35444	Kot	ja	5	-	-	B: verschiedene Organsysteme, Todesfälle	negativ	negativ
032	09.04.03	1 w	weiblich	RHF	Beselich/Limbürg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	B: DF	negativ	negativ
033	09.04.03	1 w	weiblich	HF	Beselich/Limbürg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	B: DF	negativ	negativ
034	09.04.03	10 d	weiblich	RHF	Beselich/Limbürg-Weilburg	62614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Bronchopneumonie, Lungenemphysem; B: DF	negativ	negativ
036	09.04.03	1 w	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	43	-	Klinik	B: DF	negativ	negativ
043	16.04.03	11 d	männlich	Charolais	Gründau-Liebles/Main-Kinzig-Kreis	63584	Kot	ja	12	20	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	metabol. Azidose, Bronchopneumonie	negativ	negativ
044	16.04.03	6 w	männlich	DFV	-	-	Kot	ja	28	52	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	metabol. Azidose	negativ	negativ
045	16.04.03	12 d	weiblich	DFV	Reinheim/Darmstadt-Dieburg	64354	Kot	ja	14	80	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	metabol. Azidose; B: DF	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft	PLZ	Material	Diarhöe Einzel-tier	Bestand - Nr.	Anzahl Tiere	Betriebsform/ Haltung Kälber	sonstige Symptome Einzel-tier/ Probleme Bestand	PCR NoV	PCR SaV
052	30.04.03	3 w	männlich	DFV	Reinheim/Darmstadt-Dieburg	64354	Kot	ja	14	80	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	metabol. Azidose; B: DF	negativ	negativ
053	30.04.03	5 d	männlich	DFV	Höchst/ Odenwaldkreis	64739	Kot	ja	35	45	Kälberaufzucht; Einzelhaltung, Einstreu	nein	negativ	negativ
064	07.05.03	10 w	weiblich	HF	Münstermaifeld/ Mayen-Koblenz	56294	Kot	nein	41	85	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Bronchopneumonie, Aktinomykose	negativ	negativ
065	07.05.03	4 w	männlich	Charolais x RHF	Romrod/ Vogelsbergkreis	36329	Kot	nein	42	20	Gruppen, Einstreu	gesund	negativ	negativ
071	14.05.03	12 d	weiblich	RHF	Beselich/Limburg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Trinkschwäche; B: DF	negativ	negativ
072	14.05.03	4 w	weiblich	RHF	Beselich/Limburg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Trinkschwäche; B: DF	negativ	-
073	14.05.03	6 m	weiblich	HF	Alsfeld/ Vogelsbergkreis	36404	Kot	nein	51	45	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Hernia umbilicalis, Bronchopneumonie	negativ	-
074	14.05.03	8 d	männlich	DFV	Limbach/Neckar-Odenwald-Kreis	74838	Kot	ja	50	80	Kälberaufzucht	Alopezie, festliegend; B: DF	negativ	-
078	21.05.03	3 w	männlich	DFV	Beselich/ Limburg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Anorexie, metab. Azidose, Lungenemphysem, Bronchopneumonie; B: DF	negativ	-
079	21.05.03	12 d	weiblich	DFV	Beselich/ Limburg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Hernia umbilicalis, Trinkschwäche; B: DF	negativ	-
080	21.05.03	13 d	weiblich	DFV	Beselich/ Limburg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Omphalophlebitis, Nabelbruch; B: DF	negativ	-
081	21.05.03	8 d	männlich	DFV	Beselich/ Limburg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Omphalitis; B: DF	negativ	-
082	21.05.03	7 w	weiblich	HF	Brombachtal/ Odenwaldkreis	64753	Kot	nein	56	10	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Konjunktivitis, Fieber (41,3 °C), V. a. Dermatitis solaris	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft	PLZ	Mate- rial	Diarhöe Einzel- tier	Bestand - Nr.	Anzahl Tiere	Betriebsform/ Haltung Kälber	sonstige Symptome Einzeltier/ Probleme Bestand	PCR NoV	PCR Sav
083	21.05.03	4 m	männlich	Anger x RHF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	nein	57	16	Kälberaufzucht	Gelenkhydrops Fessel vorne links, V.a. Tendovaginitis serofibrinosa	negativ	-
088	11.06.03	6 a	weiblich	Charolais	Rabenauf/ Giessen	35466	Kot	nein	67	25	Kälberaufzucht; Gruppen	V.a. Aktinomykose; B: DF	negativ	negativ
089	11.06.03	6 w	männlich	HF	Herbelhausen/ Waldeck- Frankenberg	35285	Kot	nein	68	50	Zuchtbetrieb, Kälber: Gruppen, Einstreu	Fistel rechter Ellenbogen, Stomatitis papulosa	negativ	negativ
090	11.06.03	2 w	weiblich	HF	Hungen/ Giessen	35410	Kot	ja	69	30	Kälberaufzucht; Einzelhaltung, Einstreu	Anämie, Fliegenmaden- befall	negativ	negativ
093	25.06.03	14 d	männlich	DFV	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Omphalitis, Bronchopneu- monie; B: DF	negativ	negativ
094	25.06.03	3 w	männlich	DFV	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	nein	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Bronchopneu- monie, Lungenemphy- sem; B: DF	negativ	negativ
095	25.06.03	14 d	weiblich	DFV	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	eitrige Omphalitis, metab. Azidose; B: DF	negativ	negativ
096	25.06.03	9 d	weiblich	DFV	Reinheim/Darm- stadt-Dieburg	64354	Kot	ja	14	80	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	metabol. Azidose; B: DF	negativ	negativ
097	25.06.03	3 m	männlich	DFV	Driedorf/ Lahn-Dill-Kreis	35759	Kot	nein	72	20	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	chronisch rezidivierende Bronchopneu- monie, Lungenemphysem	negativ	negativ
098	25.06.03	10 d	weiblich	HF	Feldatal/ Vogelsbergkreis	36325	Kot	ja	73	40	Mutterkuhhäl- tung; Kälber Gruppen, Einstreu	metabol. Azidose	negativ	negativ
099	25.06.03	15 d	männlich	HF	Feldatal/ Vogelsbergkreis	36325	Kot	ja	73	40	Mutterkuhhäl- tung; Kälber Gruppen, Einstreu	metabol. Azidose	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft	PLZ	Material	Diarhöe Einzel-tier	Bestand - Nr.	Anzahl Tiere	Betriebsform/ Haltung Kälber	sonstige Symptome Einzel-tier/ Probleme Bestand	PCR NoV	PCR SaV
100	25.06.03	3 w	weiblich	HF	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	ja	74	20	Mutterkuhhaltung; Kälber Gruppen, Einstreu	CCN, Nekrobazilliose	positiv	negativ
108	02.07.03	12 d	weiblich	DFV	Beselich/Limburg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Azidose; B: DF	negativ	negativ
109	02.07.03	12 d	männlich	DFV	Beselich/Limburg-Weilburg	65614	Kot	ja	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	Omphalitis, Bronchopneumonie; B: DF	negativ	negativ
121	06.08.03	4 m	weiblich	HF	Balve/ Märkischer Kreis	58802	Kot	nein	102	90	Kälberaufzucht Gruppen, kein Einstreu	Bronchopneumonie, V.a. BRSV; B: Hefemasitiden	negativ	fraglich
122	06.08.03	3 m	weiblich	HF	Driedorf/ Lahn-Dill-Kreis	35759	Kot	nein	103	60	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	chronische Bronchopneumonie; B: Atemwegsprobleme	negativ	negativ
123	06.08.03	2 m	weiblich	DFV	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	nein	104	10	Kälberaufzucht; Einzelhaltung, Einstreu	Nabelabszess, Omphalophlebitis, Bronchopneumonie, Wundheilungsstörung	negativ	negativ
124	06.08.03	4 w	männlich	HF	Herbelhausen/ Waldeck-Frankenberg	35285	Kot	nein	68	50	Zuchtbetrieb, Gruppen, Einstreu	Fistel rechter Ellenbogen, Stomatitis papulosa	negativ	-
125	06.08.03	4 w	weiblich	DFV	Beselich/ Limburg-Weilburg	65614	Kot	nein	16	100	Kälberaufzucht; Gruppen, Einstreu	akute Bronchopneumonie, Lungenemphysem, Haarlingsbefall; B: DF	negativ	-
126	13.08.03	12 d	männlich	Charolais	Mücke/ Vogelsbergkreis	35325	Kot	nein	105	16	Ammenkuhhaltung, Gruppen, kein Einstreu	Bronchopneumonie, Trinkschwäche, Selenmangel; B: DF	negativ	-
127	13.08.03	3 a	weiblich	HF	Eulenberg/ Altenkirchen	57614	Kot	nein	106	80	-	Endometritis, Dislocatio Abomasi sinister	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft	PLZ	Materi- al	Diarhöe Einzel- tier	Bestand - Nr.	Anzahl Tiere	Betriebsform/ Haltung Kälber	sonstige Symptome Einzel tier/ Probleme Bestand	PCR NoV	PCR SaV
128	13.08.03	8 2	männlich	DFV	Beselich/ Limburg- Weilburg	65614	Kot	nein	16	100	Kälberaufzucht, Gruppen, Einstreu	Pansenstricken, Dislocatio Abomasi sinister, Bronchopneu- monie; B: DF	negativ	-
133	20.08.03	16 d	weiblich	HF	Hirzenhain/ Wetteraukreis	63697	Kot	nein	109	90	Kälberaufzucht, Einzelh., Einstreu	Omphalophlebitis, Bronchopneu- monie B: DF	negativ	-
150	17.09.03	8 w	männlich	DFV	Beselich/Lim- burg-Weilburg	65614	Kot	nein	16	100	Kälberaufzucht, Gruppen, Einstreu	Bronchopneu- monie; B: DF	negativ	-
153	01.10.03	10 w	weiblich	RHF	Grünberg/ Giessen	35305	Kot	nein	128	4	Kälberaufzucht, Gruppen, Einstreu	Nabelabszeß	negativ	negativ
154	01.10.03	15 d	weiblich	HF	Hirzenhain/ Wetteraukreis	63697	Kot	ja	109	90	Kälberaufzucht, Einzelhaltung, Einstreu	metabol. Azidose, Bronchopneu- monie	negativ	negativ
171	19.11.03	15 d	männlich	DFV	Birstein-Wettges/ Main-Kinzig- Kreis	63633	Kot	ja	107	-	Kälberaufzucht, Einzelhaltung, Einstreu	metabol. Azidose, Exsikkose; B: DF, Atemwegs- probleme	negativ	-
172	19.11.03	4 w	männlich	HF	Fronhausen/ Marburg- Biedenkopf	35112	Kot	nein	144	-	-	Pneumonie, Hernia umbilicalis, Otitis media rechts	negativ	-
173	19.11.03	3 w	weiblich	RHF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	43	-	Klinik, Kälber: Gruppen, Einstreu	Husten; B: DF, Atemwegs- probleme	positiv	-
174	19.11.09	3 w	männlich	RHF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	43	-	Klinik, Kälber: Gruppen, Einstreu	B: DF	negativ	-
175	19.11.03	3 w	männlich	HF	Ulrichstein/ Vogelsbergkreis	35327	Kot	ja	93	-	-	metabol. Azidose, Exsikkose, Hernia umbilicalis, Omphalitis; B: DF, Todesfälle, verschiedene Organsysteme betroffen	negativ	-

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft	PLZ	Material	Diarhöe Einzel-tier	Bestand - Nr.	Anzahl Tiere	Betriebsform/ Haltung Kälber	sonstige Symptome Einzelier/ Probleme Bestand	PCR NoV	PCR SaV
325	30.07.04	4 w	-	HF	Frankenberg/ Waideck- Frankenberg	35066	Kot	nein	265	-	-	Omphalitis, Bronchopneumonie, Otitis media	negativ	negativ
326	30.07.04	4 w	-	HF	Frankenberg/ Waideck- Frankenberg	35066	Kot	ja	265	-	-	Nabelabszeß	negativ	negativ
327	04.08.04	18 d	weiblich	Pustata-ler X HF	Rüthen/ Soest	59602	Kot	ja	266	-	-	Dislocatio abomasi, Pansentrinker, Bronchopneumonie	negativ	-
328	04.08.05	11 w	weiblich	HF	Kronberg/ Hochtaunuskreis	61476	Kot	nein	268	-	-	Nabelbruch	negativ	-
329	04.08.04	1 w	weiblich	HF	Olpe/Olpe	57462	Kot	nein	267	-	-	Beinbruch	negativ	-
356	15.12.04	4 a	weiblich	Fleckvieh	Ober-Kainsbach/ Odenwaldkreis	64385	Kot	nein	284	16	Milchviehbetrieb, Kälber: Gruppen, Einstreu	gesund	negativ	negativ
357	16.12.04	8 d	männlich	HF	Brensbach- Wallbach/ Odenwaldkreis	64395	Kot	nein	285	170	Zuchtbetrieb, Kälber: Gruppen, Einstreu	gesund; B: DF, Atemwegsprobleme, Todesfälle	positiv	negativ
358	16.12.04	2 d	weiblich	HF	Brensbach- Wallbach/ Odenwaldkreis	64395	Kot	nein	285	170	Zuchtbetrieb, Kälber: Gruppen, Einstreu	gesund; B: DF, Atemwegsprobleme, Todesfälle	positiv	negativ
359	16.12.04	8 d	weiblich	HF	Brensbach- Wallbach/ Odenwaldkreis	64395	Kot	ja	285	170	Zuchtbetrieb, Kälber: Gruppen, Einstreu	Atemnebengeräusche, vorbehandelte mit Nulfor; B: DF, Atemwegsprobleme, Todesfälle	positiv	negativ
396	11.02.05	10 d	weiblich	HF	Fr.-Grumbach- Michelbach/ Odenwaldkreis	64407	Kot	ja	307	65	Einzelhaltung, Spaltenboden, Stall mit Weidegang	Anorexie; B: DF	negativ	negativ
397	11.02.05	10 d	weiblich	RHF	Fr.-Grumbach- Michelbach/ Odenwaldkreis	64407	Kot	ja	307	65	Einzelhaltung, Spaltenboden, Stall mit Weidegang	Anorexie; B: DF	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Rd.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft	PLZ	Mate- rial	Diarhöe Einzel- tier	Bestand - Nr.	Anzahl Tiere	Betriebsform/ Haltung Käber	sonstige Symptome Einzel- tiere/ Probleme Bestand	PCR NoV	PCR Sav
398	11.02.05	7 d	männlich	RHF	Erzbach/ Odenwaldkreis	64385	Kot	ja	309	60	Einzelhaltung, Einstreu, Stall mit Weidegang	B:DF	negativ	negativ
399	11.02.05	7 d	weiblich	HF	Reichelsheim/ Odenwaldkreis	64385	Kot	nein	308	-	Gruppenhaltung, Einstreu, Stall	gesund; B: DF	negativ	negativ
400	11.02.05	7 d	weiblich	HF	Reichelsheim/ Odenwaldkreis	64385	Kot	ja	308	-	Gruppenhaltung, Einstreu, Stall	B: DF	positiv	negativ
401	11.02.05	2 m	weiblich	DFV	Reichelsheim/ Odenwaldkreis	64385	Kot	nein	310	60	Einzelhaltung, Einstreu, Stall mit Weidegang	gesund	negativ	negativ
420	10.03.05	1 m	weiblich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	264	-	Klinik	DF seit 8 d	negativ	-
421	10.03.05	1 m	männlich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	264	-	Klinik	DF seit 5 d, Dehydratation, Pansentrinker	negativ	-
422	10.03.05	1 m	weiblich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	264	-	Klinik	DF seit 3 Wo, Hernia umbilicalis, Bronchopneu- monie	negativ	-
423	10.03.05	1 m	weiblich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	246	-	Klinik	DF seit 3 d	negativ	-
424	10.03.05	1 m	weiblich	HF	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	264	-	Klinik	DF seit 5 d, Bronchopneu- monie	negativ	-

9.1.3 Rohdaten Schwein

Probe Nr. (KP Schw.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/ Landkreis	PLZ	Material	Diarrhö Einzel- tier	sonstige Symptome Einzel- tier/ Informationen Bestand	Bestand - Nummer	Betriebs- form	Anzahl Tiere	PCR NoV	PCR SaV	PCR SaV Kapsid
001	25.04.03	-	männlich	-	Bernshausen/ Vogelsbergkreis	36110	Kot	nein	Enteritis, Anämie	37	Aufzucht/ Mast	800	negativ	negativ	negativ
002	25.04.03	1 m	männlich	-	Romrod/ Vogelsbergkreis	36329	Kot	nein	Endokarditis, Pneumonie	35	Aufzucht/ Mast	1000	negativ	negativ	negativ
003	12.05.03	-	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	nein	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
004	05.06.03	2 w	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	nein	25	Klinik	-	negativ	positiv	negativ
005	05.06.03	-	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	nein	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
006	24.08.03	-	-	Hybrid	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	Husten	47	Mast	2	negativ	negativ	negativ
007	24.08.03	-	-	Hybrid	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	Husten	47	Mast	2	negativ	negativ	negativ
008	08.09.03	-	-	-	Wohlsdorf/ Bernburg	06408	Kot	ja	nein; EM negativ	71	-	-	negativ	negativ	negativ
009	15.09.03	-	-	-	Wohlsdorf/ Bernburg	06408	Kot	ja	nein; EM negativ	71	-	-	negativ	negativ	negativ
010	16.09.03	-	-	Hybrid	Steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	52	Aufzucht/ Mast	5	negativ	negativ	negativ
011	16.09.03	-	-	Hybrid	Steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	52	Aufzucht/ Mast	5	negativ	negativ	negativ
012	16.09.03	-	-	Hybrid	Steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	52	Aufzucht/ Mast	5	negativ	negativ	negativ
013	16.09.03	-	-	Hybrid	Steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	52	Aufzucht/ Mast	5	negativ	negativ	negativ
014	16.09.03	-	-	Hybrid	Steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	52	Aufzucht/ Mast	5	negativ	negativ	negativ
015	16.09.03	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
016	16.09.03	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
017	16.09.03	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
018	16.09.03	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Schw.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/ Landkreis	PLZ	Material	Diarhöe Einzeltier	sonstige Symptome Einzel-/ Informationen Bestand	Bestand - Nummer	Betriebsform	Anzahl Tiere	PCR NoV	PCR SaV	PCR SaV Kapsid
019	16.09.03	-	-	Hybrid	Weischensteinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
020	16.09.03	-	-	Hybrid	Hofstetten/ Ortenaukreis	77716	Kot	nein	gesund	54	Aufzucht/ Mast	15	negativ	negativ	positiv
021	16.09.03	-	-	Hybrid	Hofstetten/ Ortenaukreis	77716	Kot	nein	gesund	54	Aufzucht/ Mast	15	negativ	negativ	negativ
022	16.09.03	-	-	Hybrid	Hofstetten/ Ortenaukreis	77716	Kot	nein	gesund	54	Aufzucht/ Mast	15	negativ	negativ	negativ
023	16.09.03	-	-	Hybrid	Hofstetten/ Ortenaukreis	77716	Kot	nein	gesund	54	Aufzucht/ Mast	15	negativ	negativ	negativ
024	16.09.03	-	-	Hybrid	Hofstetten/ Ortenaukreis	77716	Kot	nein	gesund	54	Aufzucht/ Mast	15	negativ	negativ	negativ
025	16.09.03	-	-	Hybrid	Hofstetten/ Ortenaukreis	77716	Kot	nein	gesund	54	Aufzucht/ Mast	15	negativ	negativ	negativ
026	16.09.03	-	-	Hybrid	Gengenbach/ Ortenaukreis	77723	Kot	nein	gesund; Rinder im Bestand	55	Aufzucht/ Mast	10	negativ	negativ	negativ
027	16.09.03	-	-	Hybrid	Gengenbach/ Ortenaukreis	77723	Kot	nein	gesund; Rinder im Bestand	55	Aufzucht/ Mast	10	negativ	negativ	negativ
028	16.09.03	-	-	Hybrid	Gengenbach/ Ortenaukreis	77723	Kot	nein	gesund; Rinder im Bestand	55	Aufzucht/ Mast	10	negativ	negativ	negativ
029	16.09.03	-	-	Hybrid	Gengenbach/ Ortenaukreis	77723	Kot	nein	gesund; Rinder im Bestand	55	Aufzucht/ Mast	10	negativ	negativ	negativ
030	16.09.03	-	-	Hybrid	Gengenbach/ Ortenaukreis	77723	Kot	nein	gesund; Rinder im Bestand	55	Aufzucht/ Mast	10	negativ	negativ	negativ
031	16.09.03	-	-	Hybrid	Gengenbach/ Ortenaukreis	77723	Kot	nein	gesund; Rinder im Bestand	55	Aufzucht/ Mast	10	negativ	negativ	negativ
032	01.10.03	10 w	männlich	-	Niederlande	-	Kot	nein	gesund	57	Versuchsbetrieb	100	negativ	negativ	negativ
033	01.10.03	10 w	männlich	-	Niederlande	-	Kot	nein	gesund	57	Versuchsbetrieb	100	negativ	negativ	negativ
034	01.10.03	10 w	weiblich	-	Niederlande	-	Kot	nein	gesund	57	Versuchsbetrieb	100	negativ	negativ	negativ
035	01.10.03	10 w	männlich	-	Niederlande	-	Kot	ja	nein	57	Versuchsbetrieb	100	negativ	negativ	negativ
036	01.10.03	-	weiblich	-	Niederlande	-	Kot	ja	nein	58	Versuchsbetrieb	100	negativ	negativ	negativ
037	01.10.03	-	männlich	-	Niederlande	-	Kot	ja	nein	58	Versuchsbetrieb	100	negativ	negativ	negativ
038	01.10.03	-	männlich	-	Niederlande	-	Kot	-	-	58	Versuchsbetrieb	100	negativ	negativ	negativ
039	01.10.03	-	männlich	-	Niederlande	-	Kot	-	-	58	Versuchsbetrieb	100	negativ	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Schw.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/ Landkreis	PLZ	Material	Diarhöe Einzel- tier	sonstige Symptome Einzel- tier/ Informationen Bestand	Bestand - Nummer	Betriebs- form	Anzahl Tiere	PCR NoV	PCR SaV	PCR SaV Kapsid
040	01.10.03	9 d	weiblich	-	Niederlande	-	Kot	ja	nein	59	Versuchs- betrieb	1500	negativ	negativ	negativ
041	01.10.03	9 d	weiblich	-	Niederlande	-	Kot	ja	nein	59	Versuchs- betrieb	1500	negativ	negativ	negativ
042	01.10.03	9 d	männlich	-	Niederlande	-	Kot	nein	gesund	59	Versuchs- betrieb	1500	negativ	negativ	negativ
043	01.10.03	9 d	männlich	-	Niederlande	-	Kot	nein	gesund	59	Versuchs- betrieb	1500	negativ	negativ	negativ
044	01.10.03	-	-	-	Echtenerbrug/ Niederlande	-	Kot	nein	gesund	60	Versuchs- betrieb	2200	negativ	positiv	negativ
045	01.10.03	-	-	-	Echtenerbrug/ Niederlande	-	Kot	nein	gesund	60	Versuchs- betrieb	2200	negativ	negativ	negativ
046	01.10.03	-	-	-	Echtenerbrug/ Niederlande	-	Kot	ja	nein	60	Versuchs- betrieb	2200	negativ	negativ	negativ
047	01.10.03	-	-	-	Echtenerbrug/ Niederlande	-	Kot	ja	nein	60	Versuchs- betrieb	2200	negativ	positiv	positiv
048	18.11.03	2 w	-	Hybrid	Giesen/Giesen	35392	Kot	ja	nein	25	Klinik		negativ	negativ	negativ
049	30.01.04	1 m	-	-	Ebsdorfergrund/ Marburg- Biedenkopf	35085	Kot	ja	nein; EM negativ	70			negativ	negativ	negativ
050	11.02.04	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
051	11.02.04	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
052	11.02.04	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
053	11.02.04	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
054	11.02.04	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
055	11.02.04	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ
056	11.02.04	-	-	Hybrid	Weischen- steinach/ Ortenaukreis	77790	Kot	nein	gesund	53	Aufzucht/ Mast	20	negativ	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Schw.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/ Landkreis	PLZ	Materi- al	Diarhöe Einzel- tier	sonstige Symptome Einzel- Informationen Bestand	Bestand - Nummer	Betriebs- form	Anzahl Tiere	PCR NoV	PCR SaV	PCR SaV Kapsid
057	16.12.03	2 w	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	ja	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
058	16.12.03	2 w	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Polyarthrit	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
059	17.12.03	3 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Rektumprolaps	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
060	18.12.03	2 w	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	gesund	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
061	07.01.04	1 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	vorher Durchfall	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
062	07.01.04	1 m	weiblich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	ja	nein	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
063	07.01.04	1 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	nein	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
064	07.01.04	1 w	weiblich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	ja	nein	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
065	07.01.04	2 w	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Ohrdrüsennekrose	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
066	07.01.04	1 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Ohrdrüsennekrose	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
067	14.01.04	1 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
068	14.01.04	1 m	weiblich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
069	14.01.04	1 m	weiblich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
070	29.01.04	1 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	ja	Panaritium	66	Klinik	-	negativ	positiv	positiv
071	29.01.04	1 m	weiblich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Nabelabszeß	66	Klinik	-	negativ	positiv	positiv
072	29.01.04	1 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	positiv	positiv
073	29.01.04	1 m	weiblich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
074	29.01.04	1 m	weiblich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
075	03.02.04	1 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	nein	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
076	03.02.04	1 m	weiblich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	ja	nein	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
077	13.02.04	1 m	männlich	-	Oberschleiss- heim/München	85764	Kot	ja	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Schw.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Or/Landkreis	PLZ	Material	Diarrhöe Einzeltier	sonstige Symptome Einzelier/Informationen Bestand	Bestand - Nummer	Betriebsform	Anzahl Tiere	PCR NoV	PCR SaV	PCR SaV Kapsid
078	13.02.04	1 m	männlich	-	Oberschleissheim/München	85764	Kot	ja	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
079	16.02.04	3 m	männlich	-	Oberschleissheim/München	85764	Kot	ja	nein	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
080	16.02.04	3 m	männlich	-	Oberschleissheim/München	85764	Kot	ja	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
081	17.02.04	3 m	männlich	-	Oberschleissheim/München	85764	Kot	nein	Pneumonie	66	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
082	23.02.04	-	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	nein; EM negativ	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
083	02.04.04	-	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	nein	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
084	02.04.04	-	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	nein	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
085	02.04.04	-	-	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	ja	nein	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
086	02.06.04	8 m	weiblich	Hybrid	Kirschweiler/Birkenfeld	55743	Kot	nein	gesund	61	Aufzucht/Mast	200	negativ	negativ	negativ
087	02.06.04	4 a	weiblich	Hybrid	Kirschweiler/Birkenfeld	55743	Kot	nein	gesund	61	Aufzucht/Mast	200	negativ	negativ	negativ
088	02.04.06	11 w	weiblich	Hybrid	Kirschweiler/Birkenfeld	55743	Kot	nein	gesund	61	Aufzucht/Mast	200	negativ	negativ	negativ
089	02.06.04	2 m	weiblich	Hybrid	Kirschweiler/Birkenfeld	55743	Kot	nein	gesund	61	Aufzucht/Mast	200	negativ	negativ	negativ
090	02.06.04	21 w	männlich	Hybrid	Kirschweiler/Birkenfeld	55743	Kot	nein	gesund	61	Aufzucht/Mast	200	negativ	negativ	negativ
091	02.06.04	4 m	weiblich	Hybrid	Kirschweiler/Birkenfeld	55743	Kot	nein	Circo, APP	61	Aufzucht/Mast	200	negativ	negativ	negativ
092	10.08.04	-	weiblich	Hybrid	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
093	10.08.04	4 m	männlich, k	Hybrid	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
094	10.08.04	4 m	weiblich	Hybrid	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
095	10.08.04	4 m	weiblich	Hybrid	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
096	15.08.04	4 m	männlich, k	Pietrain	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
097	14.08.04	2,5 a	männlich	Pietrain	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
098	15.08.04	4 m	männlich, k	Pietrain	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
099	14.08.04	2 a	weiblich	-	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Schw.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/ Landkreis	PLZ	Material	Diarhöe Einzeltier	sonstige Symptome Einzeltier/ Informationen Bestand	Bestand - Nummer	Betriebsform	Anzahl Tiere	PCR NoV	PCR SaV	PCR SaV Kapsid
100	15.08.04	4 m	weiblich	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	gesund	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
101	23.08.04	-	männlich, k	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	-	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
102	23.08.04	-	weiblich	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	-	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
103	23.08.04	-	weiblich	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	-	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
104	23.08.04	-	männlich, k	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	-	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
105	23.08.04	-	männlich, k	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	-	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
106	23.08.04	-	männlich, k	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	-	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
107	23.08.04	-	männlich, k	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	-	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
108	23.08.04	-	weiblich	Pie-train	Giessen/Giessen	35392	Kot	nein	-	25	Klinik	-	negativ	negativ	negativ
109	17.12.04	4 m	weiblich	DL/ Pie-train	Reichelsheim/ Odenwaldkreis	64385	Kot	nein	keine; Gruppenhaltung im Stall, Einstreu	62	Mast	30	negativ	negativ	negativ
110	17.12.04	4 m	weiblich	DL/ Pie-train	Reichelsheim/ Odenwaldkreis	64385	Kot	nein	keine; Gruppenhaltung im Stall, Einstreu	62	Mast	30	negativ	negativ	negativ
111	17.12.04	6 m	weiblich	DL/ Pie-train	Fr.-Crumbach/ Odenwaldkreis	64385	Kot	nein	keine; Gruppenhaltung im Stall, Einstreu	63	Mast	25	negativ	negativ	negativ
112	10.01.05	7 m	männlich	Mast-hybrid	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	Vomitus vor 6 Wochen	47	Mast	2	negativ	negativ	negativ
113	10.01.05	7 m	männlich	Mast-hybrid	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	Vomitus vor 6 Wochen	47	Mast	2	negativ	negativ	negativ
114	11.02.05	4 m	weiblich	DL/ Pie-train	Otzberg/ Darmstadt-Dieburg	64853	Kot	nein	gesund; Gruppenhaltung im Stall, Einstreu	65	Mast	30	negativ	negativ	negativ
115	11.02.05	4 m	weiblich	DL/ Pie-train	Otzberg/ Darmstadt-Dieburg	64853	Kot	nein	gesund; Gruppenhaltung im Stall, Einstreu	65	Mast	30	negativ	negativ	negativ
116	11.02.05	2 m	weiblich	DE	Reichelsheim/ Odenwaldkreis	64385	Kot	nein	gesund; Gruppenhaltung im Stall, Spaltenboden	64	Aufzucht	25	negativ	negativ	negativ
117	07.10.05	7 w	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Schw.)	Datum Probenentnahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/ Landkreis	PLZ	Material	Diarrhö Einzel- tier	sonstige Symptome Einzel- tier/ Informationen Bestand	Bestand - Nummer	Betriebs- form	Anzahl Tiere	PCR NoV	PCR SaV	PCR SaV Kapsid
118	07.10.05	7 m	-	De	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	positiv	negativ	negativ
119	07.10.05	6 m	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
120	07.10.05	6 m	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
121	07.10.05	5 m	-	De	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
122	07.10.05	5 m	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
123	07.10.05	1 m	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
124	07.10.05	1 m	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
125	07.10.05	7 m	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
126	07.10.05	6 w	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
127	07.10.05	5 w	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	negativ	negativ
128	07.10.05	1 m	-	DE	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund; Buchten: 8-10 Tiere; Spalten ohne Einstreu	67	Mast	150	negativ	positiv	negativ
129	10.10.05	-	-	-	-	-	Kot	ja	Brachyspira (Ser- pulina) hyodenteriae im Kot	69	-		negativ	negativ	negativ
130	13.02.06	8 m	-	DL	Rechtenbach/ Lahn-Dill-Kreis	35625	Kot	nein	gesund	47	Mast	2	negativ	negativ	negativ
131	21.02.06	-, +	-	-	-	-	Kot	ja	verstorben; B: 10-14 d nach Absetzen: abmagern, sterben	68	-	-	negativ	negativ	negativ

Probe Nr. (KP Schw.)	Datum Proben- ent- nahme	Alter	Geschlecht	Rasse	Herkunft Ort/ Landkreis	PLZ	Mate- rial	Diarhöe Einzel- tier	sonstige Symptome Einzel- Informationen Bestand	Bestand - Nummer	Betriebs- form	Anzahl Tiere	PCR NoV	PCR SaV	PCR SaV Kapsid
132	21.02.06	-, +	-	-	-	-	Kot	ja	verstorben; B: 10-14 d nach Absetzen: abmagern, sterben	68	-	-	negativ	negativ	negativ

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

König, M., Bank, B., Thiel, H.-J. (2004): „Noroviren und Sapoviren beim Menschen und bei Nutztieren“. Dtsch. tierärztl. Wschr. 111: S. 335-338

Abstracts:

Arbeitstagung des DVG-Arbeitskreises für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID), Bad Staffelstein, September 2004 (Vortrag):

Bank, B., König, M., Thiel, H.-J.: „Noro- und Sapoviren bei Nutztieren“

Second International Calicivirus Conference, Dijon, Frankreich, November 2004 (Poster):

Bank, B., König, M., Thiel, H.-J.: „Noro- and sapoviruses in farm animals and their relationship to human isolates“

Vortragsveranstaltung des Vereins der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin und der Oberhessischen Gesellschaft für Natur- und Heilkunde (Abt. Veterinärmedizin);

Jungtiererkrankungen, Gießen, Juni 2005 (Vortrag):

Bank, B., König, M., Thiel, H.-J.: „Durchfallerkrankungen bei Nutztieren: Nachweis von Noro- und Sapoviren“

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, März 2006 (Poster):

Bank, B., König, M., Thiel, H.-J.: „Noroviruses and Sapoviruses in farm animals“

Third European Congress of Virology, Nürnberg, September 2007 (Vortrag),

Third International Calicivirus Conference, Cancun, Mexiko, November 2007 (Vortrag):

Bank-Wolf, B., König, M., Thiel, H.-J.: „Bovine noroviruses and porcine sapoviruses: prevalence and phylogeny“

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, der Justus-Liebig-Universität, Gießen, unter der Betreuung von Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel angefertigt und in Teilen durch die Firma Intervet, Boxmeer, Niederlande, gefördert.

Ich möchte allen danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel danke ich sehr für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können sowie die Anstellung in der Privatdiagnostik, die mir viele Einblicke in die verschiedenen virologischen Untersuchungsmethoden ermöglicht hat. Vielen Dank für die Unterstützung und die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit!
- Mein herzlichster Dank gilt Dr. Matthias König. Lieber Matthias, vielen Dank für Deine Hilfe, Deinen Zuspruch und die unermüdliche Betreuung dieser Arbeit! Zusätzlich habe ich die Verwendung des Genitivs, eine Einführung in den Dadaismus und Filme, von denen ich noch nie gehört hatte, kennen gelernt.
- Meiner Kollegin, Leidensgenossin und Freundin Stefanie Deike gilt weiterhin der größte Dank für den unermüdlichen Kölner Optimismus, die Möglichkeit des Frustrationsabladens im EM-Labor, die Korrekturen dieser Arbeit in ihren verschiedenen Fassungen und die tollen EM-Bilder, die in dieser Arbeit zu sehen sind. Liebe Steffi, ohne Dich wäre die Zeit nur halb so schön gewesen!
- Meinen lateinamerikanischen Kolleginnen und Freundinnen danke ich für die Einarbeitung: Sibilina Cedillo Rosales für die Einführung in die PCR, die phylogenetischen Analysen und die Tücken der Genbank sowie Claudia Lopez für die Baculovirusexpression und die gemeinsamen Bahnfahrten.
- Danke auch an meine Probensammler Monika Grimm, Myriam Ibberson, Kathrin Lillie-Jaschniski, Norman Anthes und Anne Brümmer sowie den Mitarbeitern der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz und des Instituts für Pathologie des FB10.

- Meinen Mitdoktoranden, insbesondere Deborah (auch Dir vielen Dank für das Korrekturlesen!), Alex, Tine, Gerry, Jessica, Gleyder und Martina danke ich für die fachlichen und nicht-fachlichen Plauderstündchen in den Inkubationszeiten.
- Folgenden Personen und Institutionen und danke ich für die Bereitstellung von Proben und vor allem Referenzmaterialien, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können: Erwin Duizer, Barry Rockx und Marion Koopmans vom Research Laboratory for Infectious Diseases, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Niederlande; Jaques Rohayem und Julia Gehardt vom Institut für Virologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Dresden; Birgit Makoschey von der Firma Intervet, Boxmeer, Niederlande; Felicity D'Mello und Janice Bridger vom Royal Veterinary College, Department of Pathology and Infectious Disease, London, England und Linda Saif vom Ohio Agricultural Research and Development Center, Department of Veterinary Preventive Medicine; The Ohio State University, Wooster, Ohio, USA.
- Der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, insbesondere Dr. Klaus Failing und Marion Sparenberg, danke ich für die geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten.
- Ich danke allen Mitarbeitern des diagnostischen Labors, insbesondere Jochen und Renate für die Herstellung der Organsuspensionen, Heidrun für die EM-Diagnostik der Kotproben von Rindern sowie nicht minder allen hier nicht einzeln aufgeführten „Diagnostikern“ und Mitarbeitern des Instituts für Virologie.
- Ein herzlicher Dank gilt meinen Freunden, insbesondere Julia Oehm, bei der ich immer jammern durfte, obwohl sie keine Ahnung hatte wovon ich sprach und Myriam Ibberson, mit der ich gemeinsam nach „Hochzeit 2006“ das Projekt „Doktorarbeit 2007“ angestrebt habe. Außerdem danke ich Cynthia Bongibault, die in der „heissen Phase“ meine Eislaufkinder übernommen hat sowie Barbara Piesniewska, die immer an mich geglaubt hat.
- Meinem Mann Markus danke ich von ganzem Herzen für seine Geduld mit meinen Launen und seine liebevolle Unterstützung während all der Monate, die ich abends anstatt mit ihm mit meinem Laptop verbracht habe. Ich liebe Dich!
- Abschließend möchte ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danken, die mich während meines gesamten Studiums uneingeschränkt unterstützt haben und denen diese Arbeit gewidmet ist. Obrigado para tudo!!!

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5238-2



9 783835 952386 ⑦